

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs

Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Divergente Effekte der Substitutionstherapie
auf polymorph-nukleäre Granulozyten beim
hereditären α 1-Antitrypsinmangel**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Marc Dresel

aus Frankfurt am Main

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 21.08.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. med. Andreas Rembert Koczulla

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. Michael Zemlin

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
--------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis	VII
-----------------------------	-----

1. Einleitung	1
----------------------------	----------

1.1 α 1-Antitrypsinmangel	1
--	---

1.2 Epidemiologie	1
-------------------------	---

1.3 Die Rolle von α 1-Antitrypsin	2
--	---

1.4 Klinik.....	5
-----------------	---

1.4.1 Lunge	5
-------------------	---

1.4.2 Leber	6
-------------------	---

1.4.3 Weitere klinische Manifestationsformen	8
--	---

1.5 Diagnostik	8
----------------------	---

1.5.1 Basisdiagnostik	9
-----------------------------	---

1.5.2 Molekulare Diagnostik.....	9
----------------------------------	---

1.5.3 Lungenfunktionsprüfung	10
------------------------------------	----

1.5.4 Radiologische Bildgebung.....	11
-------------------------------------	----

1.5.5 Wissenschaftliche Ansätze.....	11
--------------------------------------	----

1.6 Therapie	13
--------------------	----

1.6.1 Prävention	13
------------------------	----

1.6.2 Medikamentös-supportiv	13
------------------------------------	----

1.6.3 Substitutionstherapie	14
-----------------------------------	----

1.6.4 Nicht-medikamentöse Therapien	16
---	----

1.7 Pathophysiologie.....	17
---------------------------	----

1.7.1 Systemische Inflammation.....	17
-------------------------------------	----

1.7.2 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten, Matrix-Metalloproteinase-9 und Interleukin-8	17
--	----

1.7.3 Myeloperoxidasen und die Oxidation von α 1-Antitrypsin.....	19
--	----

1.8 Fragestellung & Ziele der Dissertation	20
--	----

2. Material und Methoden.....	22
--------------------------------------	-----------

2.1 Untersuchungsablauf	22
-------------------------------	----

2.2 Labormethoden	23
-------------------------	----

2.2.1 Nephelometrische α 1-Antitrypsin -Konzentrations-Messungen	23
---	----

2.2.2 Herstellung von chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin	23
--	----

2.2.3	Myeloperoxidase, Matrix-Metalloproteinase-9 und Interleukin-8 ELISA	25
2.2.4	SDS-PAGE und <i>Western Blot</i>	28
2.2.5	Isolation von polymorph-nukleären Granulozyten	30
2.2.6	Stimulation der polymorph-nukleären Granulozyten im Zellkulturüberstand	31
2.2.7	Neutrophile Adhäsion	31
2.3	Statistik	32
3.	Ergebnisse	34
3.1	Patientencharakteristiken	34
3.1.1	Patientenausschluss	37
3.2	Serumanalysen	38
3.2.1	α 1-Antitrypsin-Konzentration	38
3.2.2	Myeloperoxidase und Matrix Metalloproteinase-9 als Biomarker der systemischen Inflammation	41
3.2.3	α 1-Antitrypsin <i>Western Blot</i> Analysen	48
3.3	Oxidation von α 1-Antitrypsin	59
3.3.1	Verlust der hemmenden Funktion von α 1-Antitrypsin nach Oxidation	59
3.3.2	α 1-Antitrypsin-Elastase-Komplexformierung nach Oxidation	60
3.4	<i>Ex vivo</i> Stimulation von polymorph-nukleären Granulozyten	61
3.4.1	Auswirkungen von chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin auf die Freisetzung von Myeloperoxidase, Matrix Metalloproteinase-9 und Interleukin-8	61
3.4.2	Auswirkungen von chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin auf Neutrophile Adhäsion.	67
4.	Diskussion	69
4.1	Was geschieht mit dem infundierten α 1-Antitrypsin – Abbau, Komplexierung und/oder Oxidation?	69
4.2	Welche Auswirkungen hat die Substitutionstherapie auf die Aktivierung, Degranulation und Adhäsion der polymorph-nukleären Granulozyten?	75
4.2.1	<i>In vivo</i>	75
4.2.2	<i>Ex vivo</i>	79
4.3	Ist die Myeloperoxidase nur Indikator eines systemischen, oxidativen Stresses?	83
4.4	Ist eine Verunreinigung des Infusionsproduktes für die initiale Aktivierung der polymorph-nukleären Granulozyten verantwortlich?	85
4.5	Limitationen der Studie	87
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	88

5. Zusammenfassung	90
6. Summary	92
7. Literaturverzeichnis	94
8. Anhang	116
8.1 Patienteninformation, Einwilligung und Fragebogen	116
8.2 Publikationsverzeichnis.....	120
8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer	124
8.4 Danksagung.....	125
8.5 Ehrenwörtliche Erklärung	127

Abkürzungsverzeichnis

(HR)CT	<i>(High Resolution) Computertomographie</i>
AAT	α 1-Antitrypsin
AATM	α 1-Antitrypsinmangel
cANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
CAT	<i>COPD Assessment Test</i>
COPD	<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
CRP	C-reaktives Protein
DLCO	<i>Diffusing capacity of the Lung for Carbon monoxide</i>
EBC	<i>Exhaled Breath Condensate</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FEV ₁	<i>Forced Expiratory Volume in 1 second</i>
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FVC	<i>Forced Vital Capacity</i>
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom
ICS	<i>Inhaled-Cortico-Steroids</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LABA	<i>Long-Acting β_2-Agonist</i>
LAMA	<i>Long-Acting Muscarinic-Antagonist</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MCP-1	<i>Monocyte-Chemotactic-Protein-1</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mMRC	<i>modified Medical Research Council Dyspnea scale</i>
MPO	Myeloperoxidase
NCS	N-Chlorosuccinimid
NE	Neutrophile Elastase
oxAAT	oxidiertes α 1-Antitrypsin
oxAATc	chemisch oxidiertes α 1-Antitrypsin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE-4	Phospho-Diesterase-4
Pi	Proteinaseinhibitor
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	polymorph-nukleäre Granulozyten
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RV	Residualvolumen
SABA	<i>Short-Acting β_2-Agonist</i>
SAMA	<i>Short-Acting Muscarinic-Antagonist</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SERPIN	Serin-Protease-Inhibitoren
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinase-1</i>
TLC	<i>Total Lung Capacity</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TUG	<i>Tranverse Urea Gradient</i>
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
VOC	<i>Volatile Organic Compound</i>

1. Einleitung

1.1 α 1-Antitrypsinmangel

Der α 1-Antitrypsinmangel (AATM) ist eine genetisch bedingte, autosomal-kodominant vererbte Erkrankung die durch niedrige, zirkulierende Spiegel von α 1-Antitrypsin (AAT) im Serum gekennzeichnet ist (12). Ursächlich kommt es durch eine Mutation zu einer intrazellulären Fehlfaltung des Proteins in den Hepatozyten und deren Dysfunktionalität. Betroffene Patienten entwickeln im Laufe ihres Lebens gehäuft eine chronisch obstruktive pulmonale Lungenerkrankung (COPD) mit Emphysem. Ferner kann es im Kindesalter zu ikterischen Verläufen mit Entwicklung einer Leberzirrhose kommen. In seltenen Fällen können die Patienten unspezifische Manifestationen entwickeln, die sich z. B. in Form einer Pannikulitis oder Wegener Granulomatose äußern (69,91). Einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines schweren Lungenemphysems und dem vererbten Fehlen von AAT beschrieben erstmals Laurell und Eriksson in ihrer Veröffentlichung 1963 (128).

1.2 Epidemiologie

Weltweit sind bereits über 100 genetische Varianten des AAT-Gens bekannt. Die Varianten werden nach dem Proteinaseinhibitor (Pi)-System mithilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF) eingeteilt (71). Die Einteilung erfolgt anhand der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld und deren Position zur Anode bzw. Kathode in der Gelelektrophorese. Das in der Bevölkerung häufigste vorkommende funktionale Allel wird mit dem Buchstaben PI*M bezeichnet, bei über 90 Prozent findet sich der Genotyp PI*MM. Mit einer Genfrequenz von $> 0,02$ ist das PI*Z-Allel die in Nordwesteuropa und Nordamerika am häufigsten mit einem Krankheitswert und niedrigen AAT Serumwerten assoziierte Genvariante, über 95 Prozent der klinisch relevanten AATM-Fälle werden ihr zugesprochen (23). Der Ursprung wird im Norden Europas vermutet (103). In den siebziger Jahren durchgeführte Untersuchungen an Neugeborenen in Schweden ließen erstmals Schätzungen bezüglich der Häufigkeit des PI*Z-Allels in der Bevölkerung zu und

wurden dort mit einer Genfrequenz von 0,029 angegeben (22,227). Neuere Erhebungen aus Dänemark ergaben 2002 eine Häufigkeit von 0,049 (54). Demgegenüber ist das, ebenfalls mit einem verminderten AAT Serumspiegeln assoziierte, PI*S-Allel mit einer Prävalenz von > 0,11 häufiger in Südeuropa, insbesondere der iberischen Halbinsel, vertreten (22). Gleichzeitig ist dies, nach dem PI*M-Allel, die häufigste genetische Variante (154). Schätzungen bezüglich der Gesamtzahl der laut Genotyp (PI*ZZ, PI*SS, PI*SZ) von AATM betroffenen Personen stellten Serres *et al.* mit Fokus auf unterschiedliche Regionen an. Die Autoren gehen weltweit von ca. 3,4 Mio. Betroffenen aus (212). Schätzungen für die Anzahl an homozygot Betroffenen in Deutschland schwanken zwischen etwa 8 000 Betroffenen für den PI*ZZ-Genotyp, bzw. 36 000 Betroffenen für den PI*SS-Genotyp. (22,217). Ein unerkannter AATM wird bei etwa zwei Prozent aller Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, COPD) angenommen (138).

1.3 Die Rolle von α 1-Antitrypsin

AAT ist ein aus 394 Aminosäuren bestehendes, 52 kDa schweres, ubiquitäres Akute-Phase-Glykoprotein aus der Gruppe der Serin-Protease-Inhibitoren (auch SERPIN oder Serum-Trypsin-Inhibitoren). Es wird zu 70-80 Prozent von Hepatozyten sowie lokal in kleinerem Maße von Typ II Pneumozyten, Monozyten, Makrophagen, Intestinal-, Kornealzellen und polymorph-nukleären Granulozyten (PMNs) produziert (25,82,106,177,183,197). Die normale Serumkonzentration schwankt beim Gesunden je nach Messmethode, zwischen 0,8-2,2 g/l (Nephelometrie) bzw. 1,5-4,0 g/l (radiale Immundiffusion) (226). Die Verteilung im Körper ist nicht gleichmäßig, die Konzentration auf Höhe des epithelialen Flüssigkeitsfilms im unteren Respirationstrakt beträgt etwa 10-15 Prozent der Serumkonzentration (99). Ein protektiver Schwellenwert von AAT wird ab einer Serumkonzentration von 0,5 g/l (bzw. 11 μ mol/l, beides nephelometrisch) angenommen (222,226). Hier liegen Patienten mit einer PI*Z-Variante mit 10-20 Prozent des normalen Serumspiegels bedeutend niedriger als solche mit einer PI*S-Variante zwischen 50-60 Prozent. Unter anderem sind Patienten mit PI*Z-Mutation auch deshalb häufiger von einem schwerem AATM mit

Lungenemphysem betroffen (72,259). Das für AAT codierende SERPINA1 Gen (früher bekannt als Pi-Genort) befindet sich auf Chromosom 14. Strukturell ist das Protein aus drei β -Faltblättern aufgebaut, deren funktionelles Zentrum als Substrat für die Proteasen und folglich bei deren irreversibler Hemmung fungiert (85,142,149).

Bei der in Nordeuropa häufigen Mutation PI*Z kommt es durch einen Einzelnukleotid-Polymorphismus zu einer Aminosäuren-Substitution von Glutaminsäure zu Lysin an Position 342 (Glu³⁴²Lys) (113). In der Folge ändert sich die β -Faltblatt-Struktur so, dass durch Entstehung einer Spaltöffnung im Protein ein zweites Molekül mit seiner reaktiven Schleife andocken kann, auch bekannt als *loop-sheet insertion* (146). Daraus resultieren Polymere im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Hepatozyten die nicht sezerniert werden, Einschlusskörperchen bilden und zum Untergang der Leberzellen führen können (37). Auftretende Lebererkrankungen reichen von einer kurzzeitigen Gelbsucht bis hin zur Leberzirrhose. Bei der PI*S Mutation kommt es zu einem Austausch von Glutaminsäure zu Valin an Position 264 (Glu²⁶⁴Val). Diese Strukturveränderung am β -Faltblatt fällt weniger radikal aus, der Serummangel ist hier geringer ausgeprägt. Es kommt zu keiner Polymerbildung und einer nur leicht verminderten Funktionalität des Proteins (147,175). Die Träger des Genotyps PI*MS oder PI*SZ zeigen häufig gering erniedrigte Serumspiegel und fallen nur in seltenen Fällen klinisch auf. Ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Lungenemphysems, nicht aber für Lebererkrankungen, stellt der Genotyp PI*00 dar. Hier ist kein Serumspiegel für AAT messbar (79,153). Eine PI*Z-Mutation führt indes zu unterschiedlichen Folgen und Ausprägungen des AATM: 1. Ein Schlüsselmechanismus der Leberpathophysiologie ist die Akkumulation des mutanten Z-AAT-Proteins. Zu 85 Prozent im endoplasmatischen Retikulum, erreicht es nur unvollständig bzw. verlangsamt seine endgültige Konformation und bildet die oben beschriebenen, nicht-kovalenten Polymere. Diese werden wiederum von Hepatozyten retiniert und können langfristig unlösliche Aggregate im ER-Lumen bilden (6,53,145). Zusätzliche Schädigung der Mitochondrien enden in einer Autophagie und apoptotischen Signalkaskade der Hepatozyten (129,140,162). Bei Personen des PI*SS bzw. PI*MS-Genotyps scheint die Frequenz einer Lebererkrankung weitaus geringer zu sein. AAT

wird nur bei einem gleichzeitigen Vorkommen von Z-AAT-Molekülen in derselben Zelle polymerisiert und retiniert (26,151,160).

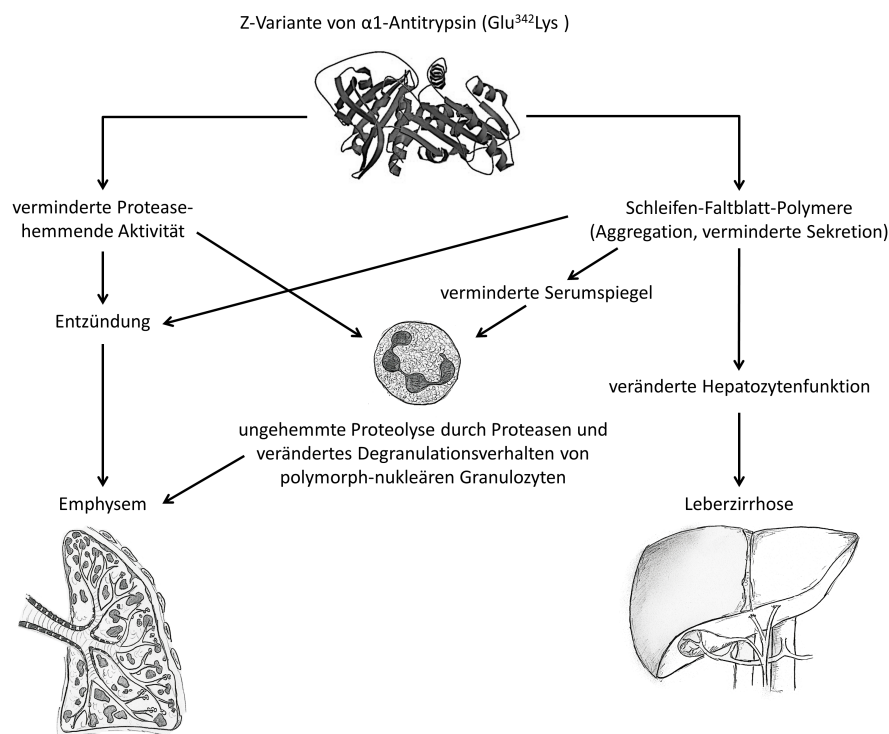


Abbildung 1. Die Pathophysiologie der Z-Variante des α 1-Antitrypsins

Die Punktmutation im SERPINA-Gen führt bei PI*Z-Trägern zu einer Aminosäuresubstitution von Glutamin an Position 342 zu Lysin. Die gebildete Z-AAT-Form ist nur zu einer herabgesetzten Inhibition der neutrophilen Elastase befähigt, in der Lunge kommt es durch die ungebremste Elastaseaktivität zu Entzündungen und Gewebeabbau. In der Leber polymerisiert Z-AAT, bildet Einschlusskörperchen in den Hepatozyten die zu einer Leberzirrhose führen können. Die Serumkonzentration von AAT ist insgesamt vermindert.

Zeichnerische Gestaltung durch Thorsten Dresel. Modifiziert nach Alpha-1-Antitrypsin-Mangel: Pathophysiologie, Diagnose und Therapie. Bals, R. und Köhnlein, T., Thieme 2010.

2. Die nach heutigem Verständnis angenommene Basis für die pulmonale Manifestation des AATM und die Entwicklung eines Lungenemphysems bildet das Ungleichgewicht zwischen degradierenden Proteasen und inhibierendem, funktionellem AAT. Als natürliches Substrat für AAT fungieren im Körper unter anderem die neutrophile Elastase (NE), Proteinase-3 und Cathepsin G (85,142,149). Neuere Untersuchungen deuten auf eine Potenzierung der Lungengerüstdegradation durch kollektives Vorkommen der drei Proteinasen bei fehlender Inhibition hin (88). Mutantes Z-AAT inaktiviert die Proteasen verzögert und ist zusätzlich nur in geringeren Mengen in der Peripherie vorhanden. Es bildet instabile AAT-Elastase-Komplexe und ist insgesamt weniger wirksam als die M-AAT-Form (141,170). Ein Ungleichgewicht

zugunsten der neutrophilen Proteasen führt zu einem emphysematischen Umbau der Lunge durch eine Bindegewebsdestruktion. 3. Strittig ist die Wirkung von AAT-Polymeren auf den Progress des AATM. In der Literatur wird ihre Rolle als pro-inflammatorische Proteine, im Speziellen in Bezug auf PMNs, diskutiert. Neben der Aggregation in der Lunge, beobachteten Parmar und Mahadeva *et al.* eine chemotaktische Wirkung auf PMNs (143,152,182). Andere konnten keinen Hinweis auf eine eigenständig pro-inflammatorische Wirkung auf PMNs finden (107,187).

1.4 Klinik

Die klinische Manifestation des AATM lässt sich im Wesentlichen drei Organsystemen zuordnen: der Lunge, der Leber und der Haut. Der eigentliche Verlauf und die Ausprägungen des AATM können dabei individuell sehr unterschiedlich sein. Der weitaus häufigste Manifestationsort der Krankheit betrifft die Lunge und äußert sich dort als eine Form der COPD mit panazinärem Lungenemphysem (260). Seltener kommt es durch die Polymerisation der AAT-Moleküle in den Hepatozyten zu einer Hepatitis (145). In wenigen Fällen führt der AATM zu einer nekrotisierenden Pannikulitis, Psoriasis und Vaskulitiden (15,69,247).

Die durchschnittliche Dauer zwischen den ersten Symptomen der Krankheit und der Diagnose des AATM schwankt zwischen 5,6 und 7,2 Jahren und hat sich in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verändert. 43 Prozent der Patienten werden von min. drei Ärzten, bzw. zwölf Prozent der Patienten von sechs bis zehn Ärzten gesehen bevor die Diagnose gestellt wird. Das durchschnittliche Diagnosealter liegt bei etwa 45,5 Jahren (32,224).

1.4.1 Lunge

Bei einer dauerhaften Unterschreitung des AAT-Serumspiegels unter 0,5 g/l (bzw. 11 µmol/l) steigt die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer COPD und einem panazinärem Lungenemphysem, der häufigsten Todesursache bei Patienten mit AATM (126). Verantwortlich gemacht wird dies durch ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen (51,159). Neben der genetischen Prädisposition ist das

Rauchen der wichtigste Risikofaktor. Dabei geht man von einer vermehrten Oxidation von AAT durch Zigarettenrauch aus (34,108). Der Verlauf bei Rauchern ist stark progredient, überproportional zur Rauchexposition und kann den Beginn einer Dyspnoe um bis zu 19 Jahre nach vorne verlegen (111,189). Weitere Risikofaktoren bestehen in einer Staubexposition im Arbeitsalltag, einer positiven Familienanamnese für COPD sowie einer positiven Anamnese für chronische Bronchitis, Asthma bronchiale und Pneumonie (59,215).

Die ersten Beschwerden die AATM-Patienten laut einer Befragung des Deutschen α 1-Antitrypsin-Registers angeben, bestehen in einer Belastungsdyspnoe (61 Prozent), Husten mit Auswurf (13 Prozent), Husten ohne Auswurf (10 Prozent), anfallsweiser Dyspnoe (3 Prozent) und einer Ruhedyspnoe (2 Prozent) (122). Dazu kommen krisenhafte Verschlechterungen des Allgemeinzustandes, meist in Form von pulmonalen Exazerbationen (248). In einem Auszug des NHLBI-Registers berichten 30 Prozent der AATM-Patienten über gesundheitliche Einschränkungen ab einem durchschnittlichen Alter von 46 Jahren (60). Einige Überschneidungen der Symptomatik finden sich mit dem Asthma bronchiale. In einer Nachfolge-Studie von Piittulainen *et al.* mit 124 AATM-Patienten im Alter von 22 Jahren zeigt sich, bei einer annähernd normalen Lungenfunktion, eine relativ hohe Prävalenz für asthmatische Symptome (15 Prozent) bzw. bronchiale Hyperreagibilität, insbesondere bei Rauchern (190). Ein ähnlich hohes Auftreten von Asthma (21 Prozent) wird in einer über 1 000 Patienten umfassenden Kohorte bestätigt (63). Weitere Gründe die an einen AATM denken lassen, bestehen bei jungen Patienten (< 45 Jahre) mit Lungenemphysem, insbesondere bei Nicht- bzw. Wenigraucherstatus, hauptsächlich basilären Veränderungen im Röntgen-Thorax bzw. der CT, einer positiven Familienanamnese mit Lungenemphysem und Lebererkrankungen und im Besonderen nicht-erklärbaren Zirrhosen und hepatozellulären Karzinomen (29,261).

1.4.2 Leber

Patienten der Pi*Z-Variante und selteneren Genvarianten können im Neugeborenenalter und späten Erwachsenenalter aufgrund der Akkumulation des

fehlgefalteten AATs in der Leber zur Entwicklung von Lebererkrankungen neigen. Bei der Pi*00 Variante besteht aufgrund der fehlenden AAT-Expression keine Gefahr für einen Zellschaden (202). Die intrazelluläre *loop-sheet* Polymerisation von AAT und anschließende Akkumulation im ER der Hepatozyten kann bei Betroffenen zum Zelluntergang führen. Die genauen Gründe für den Zelltod und die Entwicklung einer Lebererkrankung, die nicht bei allen Trägern des AATM auftritt, sind nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich ist, dass die intrazelluläre Akkumulation zu einer Schädigungskaskade führt, die die Aktivierung der Apoptose durch Mitochondrien und Autophagie-Signalwege miteinschließt (11). Unterschiede im Schweregrad der Patienten lassen vermuten, dass unterschiedliche genetische Varianten und Umweltfaktoren zur Entwicklung einer fortgeschrittenen Lebererkrankung beitragen und diese modifizieren (179).

Eine große Rasterstudie aus dem Jahre 1976 von Sveger und Kollegen schließt über 200 000 Neugeborene mit ein, davon 120 mit Pi*Z Status, von denen 14 einen prolongierten Ikterus entwickeln und neun klinische Zeichen und Laborparameter die einer Lebererkrankung entsprechen. Weitere fünf Prozent der Neugeborenen entwickeln eine Hepatomegalie mit erhöhten Transaminasen, Aszites und Blutungen (227). Die in einigen Fällen entstehende neonatale Cholestase kann charakterisiert sein durch Bauchdehnung, Pruritus und Gedeihstörungen (11). In einer Nachfolgestudie zeigt sich, dass 21 Prozent der Kinder mit neonataler Hepatitis eine Zirrhose entwickeln, wobei 14 Prozent an den Folgen versterben. Im Alter von 18 Jahren zeigen nur noch 12 Prozent der Patienten erhöhte Leberwerte (228). Eine weitere Studie beschäftigt sich mit dem Verlauf von Patienten mit Pi*ZZ-Genotyp. Hier entwickeln 10-15 Prozent der Neugeborenen eine Hepatitis mit teils sehr unterschiedlichen klinischen Verläufen (102).

Im Erwachsenenalter präsentiert sich die Lebererkrankung häufig als eine chronische, zirrhotische oder nicht-zirrhotische Hepatitis, die dem Bild einer alkoholischen Genese ähnelt. Autopsiestudien lassen vermuten, dass bis zu 40 Prozent der adulten Pi*ZZ Träger zumindest einen histologischen Leberschaden davontragen bzw. eine Zirrhose ausbilden (205). Ein weiterer Risikofaktor besteht in der Entwicklung eines

hepatozellulären Karzinoms (HCC), das auch ohne das vorherige Auftreten einer Leberzirrhose auftauchen kann. Die Wahrscheinlichkeit eines HCC ist beim männlichen Geschlecht erhöht (67,257).

1.4.3 Weitere klinische Manifestationsformen

Abgesehen von den häufigeren Manifestationen an Lunge und Leber treten einige seltenere Erkrankungsformen des AATM in der Haut, der Niere und dem Gastrointestinaltrakt auf. Die häufigste dermatologische Ausprägung des AATM ist die Pannikulitis. Daneben kann es zu Vaskulitiden, Psoriasis, Urtikaria und Angioödem kommen (226). Die Pannikulitis tritt als rote, schmerzhaft, teilweise nekrotisierende Knötchen an leicht zu traumatisierenden und exponierten Stellen, wie den Schenkeln, dem Gesäß oder dem Bauch auf (91,158). Bei einer ungewöhnlicheren Variante des AATM kommt es zu einer membranoproliferativen Glomerulonephritis oder einer Immunglobulin-A Nephropathie, die in Kombination mit einer hepatischen Zirrhose auftritt (56,167). Ein weiterer Zusammenhang wird durch das ungewöhnlich häufige Auftreten von Patienten mit AATM und einer Multisystemvaskulitis (Wegener Granulomatose und mikroskopische Polyangiitis) beobachtet. Insbesondere Patienten mit cANCA (Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper)-positiver Vaskulitis sind gehäuft Pi*ZZ homozygot (69,169).

1.5 Diagnostik

Die Seltenheit der Erkrankung AATM und die Ähnlichkeit zum Verlauf der COPD erklärt, warum sich die Zeit bis zur richtigen Diagnosestellung (siehe 1.4) oft über Jahre hinzieht, teils wird diese gar nicht gestellt. Der Verdacht auf einen AATM bzw. Gründe für eine weitere Diagnostik sollte bei einem früh einsetzenden Lungenemphysem ohne erkennbare Risikofaktoren, besonders bei basaler Betonung, und einer familiären Häufung des Emphysems bestehen. Tabelle 1 zeigt Empfehlungen die laut *American Thoracic Society Leitlinien 2003* zu einer grundlegenden Diagnostik führen sollten (226).

Tabelle 1.

Diagnostische Empfehlungen für eine quantitative Bestimmung des α 1-Antitrypsin-Spiegels

1. Fehlende α 1-Antitrypsin-Bande in der Serum-Gelelektrophorese
2. Früher Beginn eines pulmonalen Emphysems
3. Familienangehörige mit bekanntem α 1-Antitrypsinmangel
4. Dyspnoe und Husten bei Familienmitglieder der gleichen oder unterschiedlicher Generationen
5. Lebererkrankung unklarer Genese
6. Patienten mit chronisch obstruktiver Krankheit (COPD)
7. Erwachsene mit Bronchiektasien ohne klare Ätiologie
8. Nicht-reversible Asthmatiker
9. Nicht-reversible Pannikulitis und Anti-Proteinase-3 Vaskulitis

Modifiziert nach *American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency, 2003*

1.5.1 Basisdiagnostik

Die internistische Basisdiagnostik eines Patienten mit AATM umfasst die Anamnese, inkl. der Familienanamnese, die körperliche Untersuchung und eine Basislaboruntersuchung mit einer quantitativen Bestimmung des AAT-Spiegels im Serum. In die Laboruntersuchung sollten auch Lebertransaminasen für den Fall einer hepatischen Manifestation des AATM miteingeschlossen werden. Diese sollten im Verdachtsfall durch eine sonographische Untersuchung ergänzt werden. Die Lungenfunktionsuntersuchung beinhaltet eine Spirometrie bzw. Ganzkörperplethysmographie (226).

1.5.2 Molekulare Diagnostik

Der heutige Goldstandard zur quantitativen Bestimmung von AAT im Patientenserum ist die nephelometrische Bestimmung. Historisch zu erwähnen ist die radiale Immundiffusion, die aber aufgrund eines Überschätzens der AAT-Konzentration von bis zu 35-40 Prozent zunehmend seltener angewandt wird (161). Eine umfangreichere, qualitative Testung ist erforderlich, wenn AAT-Serumspiegel von unter 0,8 g/l (kann je nach Labor variieren) festgestellt werden. Da AAT in seiner Funktion als

Akutes-Phase-Protein während inflammatorischer Prozesse im Körper ansteigt, besteht die Gefahr eine Erniedrigung zu übersehen. Aus diesen Gründen wird die parallele Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) empfohlen. Finden sich erniedrigte AAT-Serumwerte, wird eine qualitative Testung angeschlossen. Es werden zwischen einer Phänotypisierung mittels IEF, bei der das AAT-Protein seiner Ladung entsprechend wandert und der Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) unterschieden. Bei unklaren Ergebnissen der PCR bzw. unbekannter Mutation wird eine direkte Gensequenzierung durchgeführt (134,163).

1.5.3 Lungenfunktionsprüfung

Fester Bestandteil der Diagnostik ist die Überprüfung der Lungenfunktion: in der Spirometrie bzw. der Ganzkörperplethysmographie wird die Reduktion der forcierten Einsekundenkapazität (*Forced Expiratory Volume in 1 second*, FEV₁), der forcierten Vitalkapazität (*Forced Vital Capacity*, FVC) sowie der FEV₁/FVC-Ratio beurteilt. Die Einteilung erfolgt anhand der GOLD-Klassifikation (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*). Ein Nachteil sind tagesabhängige Schwankungen der Spirometrie und die Fokussierung auf die Einschätzung der obstruktiven Komponente der Lungenerkrankung (31,242,244). Weitere Messparameter sind die zunehmende Lungendehnbarkeit (*Compliance*), das erhöhte Residualvolumen (RV) und die totale Lungenkapazität (*Total Lung Capacity*, TLC). Eine bessere und genauere Möglichkeit bietet die Messung der abfallenden Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität (*Diffusing capacity of the Lung for Carbon monoxide*, DLCO), bedingt durch die vergrößerte Sauerstoff-Diffusionsstrecke. Insbesondere die emphysematische Komponente der Lungenerkrankung lässt sich durch den DLCO spezifischer und sensibler beurteilen als durch die FEV₁ (58,219). Beide Parameter korrelieren nur schlecht miteinander und sollten deshalb unabhängig voneinander betrachtet werden (31,132). Eine kardiopulmonale Testung, z. B. mit Gehtest, gibt Aufschluss über eine erniedrigte Sauerstoffsättigung und erhöhte Atemfrequenzen. Um objektiv ein Asthma bronchiale abzugrenzen kann die Reversibilität der Atemwegsobstruktion mit kurzwirksamen Beta-2-Mimetika in der Lungenfunktion überprüft werden (208).

1.5.4 Radiologische Bildgebung

Ein weiterer Bestandteil der Diagnostik ist die Bildgebung. Späte Stadien des AATM sind im Röntgen-Thorax als Hyperinflation, Abflachung des Zwerchfells und einer verstärkten Transparenz der Lunge in den basalen Lungenabschnitten zu erkennen. Eine neuere Methode bietet die hochauflösende Computertomographie (*High Resolution Computer Tomography*, HR-CT) oder auch Lungendensitometrie. Sie ist sensitiver für die Detektion der morphologischen Veränderungen der Lunge und lässt auch Aussagen über die Progression des Emphysems zu. Anwendung findet sie bisher hauptsächlich in wissenschaftlichen Studien (50,61,133,150).

1.5.5 Wissenschaftliche Ansätze

Abgesehen von den oben aufgeführten etablierten Methoden beschäftigen sich unterschiedliche Forschungsgruppen mit der Suche nach neuen Methoden, die sowohl eine Aussage über den Schweregrad, als auch die Progression geben sollen. Des Weiteren wird nach neuen, nicht-invasiven diagnostischen Methoden gesucht die mit einem geringeren Kosten- und Zeitaufwand für Patient und klinisches Personal einhergehen sollen.

1.5.5.1 Biomarker

Biomarker hängen meist mit den pathophysiologischen Prozessen des Lungenumbaus zusammen. Arbeitsgruppen um Lindberg und Fregonese *et al.* stellen eine Korrelation zwischen den steigenden EZM-Abbauprodukte Desmosin und Isodesmosin in Plasma und Urin, mit dem Abfall der FEV₁ und DLCO über einen Zeitraum von 14 Monaten fest. Die Werte zwischen den Patienten variierten allerdings stark (78,98,139). Als weiterer mögliche Marker, insbesondere in Sputen von COPD-Patienten, werden die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Leukotrien B4 (LTB-4) diskutiert (171,220).

1.5.5.2 Atemwegskondensat

Eine neue, nicht-invasive und einfache Methode zur Gewinnung von Patientenproben ist die Generierung von Atemwegskondensat (*Exhaled Breath Condensate*, EBC). Dabei

wird die ausgeatmete Luft heruntergekühlt und das Kondensat aufgefangen (166). Ausgeatmete Luft enthält unterschiedlichste volatile organische Bestandteile (*Volatile Organic Compounds*, VOCs), die ein chemisches Abbild des epithelialen Flüssigkeitsfilms der Lunge sowie des gesamten Stoffwechsels bilden. Bisherige Studien beschäftigen sich hauptsächlich mit unspezifischen Markern wie dem pH-Wert und der Leitfähigkeit des Kondensats. Neueren Studien gelingt auch der Nachweis von AAT, diversen pro-inflammatorischen Chemokinen und Tumormarkern im EBC (36,121,213).

1.5.5.3 Elektronische Nasen und Gaschromatographie

Eine elektronische Nase (*electronic Nose*, *eNose*), besteht aus unterschiedlichen chemischen Nanosensoren mit einem intelligenten, dazulernenden Algorithmus (135,234). Die *eNose* reagiert auf die VOCs mit unterschiedlichen Mustern bzw. Kombinationen der Sensoren, sogenannten *smellprints*, die sich in der anschließenden Analyse mit Hilfe von Muster-Erkennungs-Algorithmen unterschiedlichen Gruppen zuordnen lassen. Dies ermöglicht die Differenzierung unterschiedlicher Krankheitsgruppen. Es konnten bisher schon Lungenkrebspatienten, Asthmatiker und COPD-Patienten von gesunden Kontrollgruppen abgegrenzt werden (62,75). Hattesoehl und Kollegen gelingt es mittels elektronischer Nase zwischen einer Gruppe von COPD-Patienten und Patienten mit AATM zu differenzieren. Zusätzlich gelingt eine Unterscheidung der Patienten mit AATM vor und nach einer AAT-Substitutionstherapie (90). Eine Gruppe um Van de Kant analysiert unter anderem sieben Studien mit insgesamt 527 COPD-Patienten und die Abgrenzung dieser zu anderen Gruppen mittels VOCs (117). Es stellt sich heraus, dass generell eine gute Unterscheidung unterschiedlicher Krankheitsprofile durch *smellprints* möglich ist, die Abgrenzung zu ehemaligen Rauchern sich aber schwierig gestaltet (13). Insbesondere Produkte der Oxidation, z. B. Hydrocarbone, die bei der Lipidmembranoxidation entstehen und für inflammatorische Prozesse sprechen, scheinen interessante und gut messbare Metabolite des (patho) physiologischen Stoffwechsels zu sein. Eine weitere etablierte Methode ist die Gaschromatographie, bei der VOCs auf Basis ihrer chemischen Eigenschaften separiert, ionisiert und dann nach ihrem Masse-Ladungs-Ratio aufgetrennt werden. Hier ist, im Gegensatz zur *eNose*, eine genaue Analyse der

Bestandteile möglich. Durch die Analyse der VOC-Profile erhofft man sich die Möglichkeit einer früheren Diagnosefindung bei Lungenerkrankungen, Phänotypisierung (z.B. bei AATM), praktikablere große *Screening*-Untersuchungen und eine bessere Verlaufsdagnostik, z. B. bei der Vorhersage von Exazerbationen (117).

1.6 Therapie

Für das therapeutische Management des AATM stehen unterschiedlichste Maßnahmen zur Verfügung. Diese lassen sich in präventive, medikamentös-supportive, rehabilitative und chirurgische Maßnahmen sowie in die Augmentations- bzw. Substitutionstherapie aufgliedern.

1.6.1 Prävention

Größten Einfluss auf den weiteren Verlauf der Lungenerkrankung, den Beginn der ersten Symptome und die weitere Lebenserwartung bei Patienten mit AATM hat der Raucherstatus: die Abnahme der FEV₁ zwischen Raucher und Ex-Rauchern unterscheidet sich nicht, Ex-Raucher zeigen aber ein besseres Langzeitüberleben (70). Zusätzlich sollten Patienten (berufliche) Atemwegsnoxen wie Staub und Rauch meiden und Atemwegsinfekten, die Exazerbationen begünstigen, durch Impfungen vorbeugen (226).

1.6.2 Medikamentös-supportiv

Die medikamentöse Therapie des AATM orientiert sich an den Leitlinien der nicht-hereditären COPD und zielt hauptsächlich auf ein Atemwegsmanagement zur Kontrolle der Dyspnoe ab. Exazerbationen werden häufig mit Antibiotika, insbesondere mit Makroliden behandelt (124).

Tabelle 2. Stadienabhängige, medikamentöse Behandlung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD)

Die Einteilung in die GOLD-Stadien erfolgt nach Lungenfunktionswerten, Exazerbationshäufigkeit und der Symptomatik, die mit Hilfe des *COPD Assessment Test* (CAT) und des *modified Medical Research Council Dyspnea scale* (mMRC) beurteilt wird.

GOLD = *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*, SABA = *Short-Acting β_2 -Agonist*, SAMA = *Short-Acting Muscarinic-Antagonist*, LABA = *Long-Acting β_2 -Agonist*, LAMA = *Long-Acting Muscarinic-Antagonist*, ICS = *Inhaled-Cortico-Steroids*, PDE-4 Inhibitor = *Phospho-Diesterase-4-Inhibitor*

GOLD Stadium	1. Wahl	2. Wahl	weitere Alternativen
A	SAMA oder SABA	LAMA oder LABA oder SABA + SAMA	Theophyllin
B	LAMA oder LABA	LAMA + LABA	Theophyllin SABA +/oder SAMA
C	ICS + LABA oder LAMA	LAMA + LABA oder LAMA + PDE-4-Inhibitor oder LABA + PDE-4-Inhibitor	Theophyllin SABA +/oder SAMA
D	ICS + LABA +/oder LAMA	ICS + LABA + LAMA oder ICS + LABA + PDE-4-Inhibitor oder LAMA + LABA oder LAMA + PDE-4-Inhibitor	Theophyllin Carbocystein SABA +/oder SAMA

Modifiziert nach *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary, updated 2014*

1.6.3 Substitutionstherapie

Die einzige Therapie, die eine weitere Progression des Lungenemphysems verlangsamen soll, besteht in der Beseitigung des Defizits durch eine intravenöse Substitution von humanem, aus Plasma aufgereinigtem AAT. In einer der ersten Arbeiten konnten Wewers *et al.* zeigen, dass eine intravenöse Substitution zu erhöhten AAT-Spiegeln in der bronchoalveolären Lavage führt (251). Biochemische Studien

konnten eine Abnahme von LTB-4 im Sputum von AATM-Patienten feststellen (220). Kurzzeitige positive Effekte bestehen in der Reduktion der Interleukin-8 (IL-8) Spiegel und der Herabregulation von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), beides direkt nach Infusion (20,203).

Das einzige für die Substitutionstherapie in Deutschland zugelassene Produkt ist Prolastin® von Grifols. Weitere Hersteller sind CSL Behring mit Zemeira® und Baxter mit Aralast®. Nach standardisiertem therapeutischem Vorgehen werden dem Patienten wöchentliche Infusionen von 60 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Das Ziel ist, die protektive Schwelle von 0,5 g/l im Verlauf einer Woche nicht zu unterschreiten. Studien mit anderen Therapieregimes zeigen, dass die wöchentliche Applikation für den Erhalt des Serumspiegels am günstigsten ist (100,204,223). Die Voraussetzungen für den Beginn einer Substitutionstherapie sind ein bestätigter Hochrisiko-Phänotyp (PI*ZZ, PI*ZO oder PI*OO), AAT-Serumspiegel unter 0,8 g/l, ein progressives panazinäres Emphysem mit dokumentierter Abnahme der FEV₁ und Nichtraucherstatus.

In mehreren Studien wird bisher versucht die klinische Wirksamkeit der Substitutionstherapie zu belegen. Seersholm *et al.* zeigen, dass die Abnahme der FEV₁ durch die Substitutionstherapie signifikant um 21 ml/Jahr gegenüber nicht-substituierten Patienten gesenkt werden kann. Dies beschränkt sich auf die Gruppe der Patienten mit einer FEV₁ *pred.* von 31-65 Prozent (208). Ähnliche Ergebnisse können Wencker und Kollegen vorweisen: sie untersuchten die FEV₁ *pred.* vor und nach Therapiebeginn bei 96 AATM-Patienten und verfolgten diese für ein Jahr. Die Abnahme der FEV₁ in der Gruppe der substituierten Patienten ist um 15 ml/Jahr geringer als bei Nicht-substituierten (250). Die größte Patientenkohorte wird in einer Studie des *National Institutes of Health*-Registers analysiert: 1 129 Patienten mit AATM wurden für 3,5-7 Jahre nachverfolgt. Patienten mit Substitution weisen eine geringere Mortalität sowie eine geringere Abnahme (27 ml/Jahr) der FEV₁ *pred.* in der Gruppe der Patienten zwischen 35-49 Prozent auf. Patienten mit einer FEV₁ *pred.* > 80 Prozent zeigen eine raschere Abnahme. Die Autoren hier gehen ausschließlich von einem Vorteil für eine Subgruppe aus (262). In zwei randomisierten, doppel-blinden und

placebo-kontrollierten Studien mit 58 bzw. 77 Teilnehmern erhielten die Patienten über einen Zeitraum von 2,5 bzw. 3 Jahren entweder wöchentliche AAT- oder Albumin-Infusionen. Tägliche, von den Patienten durchgeführte, spirometrische Messungen können keine signifikanten Unterschiede beim Abfall der FEV₁ feststellen. Es wird aber eine geringere Abnahme der Lungendichte im HR-CT und eine Reduktion des Exazerbations-Schweregrads festgestellt (60,61). Eine Internetbefragung von AATM-Patienten deutet auf eine Reduktion der Exazerbationen pro Jahr hin (137). Eine eindeutige klinische Wirksamkeit der AAT-Substitutionstherapie kann nach dem Stand der derzeitigen Literatur nicht erbracht werden.

1.6.4 Nicht-medikamentöse Therapien

Eine unterstützende Maßnahme im fortgeschrittenen Emphysemstadium bei Patienten mit Sauerstoff-Partialdrücken unter 55 mmHg besteht in der Applikation von Sauerstoff. Dieser sollte über mindestens 16 Stunden pro Tag im Rahmen einer Sauerstofflangzeittherapie verabreicht werden (226). Eine weitere Möglichkeit ist die multimodale, pulmonale Rehabilitation die sich aus kardiovaskulärem Fitnesstraining, Stresskontrolle und einer Trainingstherapie zusammensetzt. Diese kann zu einer Verbesserung der Dyspnoe und Reduktion der Hospitalisierungen führen (263). Die Vorteile einer Trainingstherapie bestehen in der Verbesserung der allgemeinen Leistungsfähigkeit, Lebensqualität, Mortalität und Steigerung der Muskelkraft (193,194). Eine Studie bei COPD-Patienten kann zeigen, dass bereits niedrig-frequentes, individualisiertes Training über drei Monate zu einer Verbesserung der Gehstrecke und der Zunahme der Muskelmasse führt (86).

Chirurgische Maßnahmen beinhalten die Lungenvolumenreduktion, die nach anfänglicher Verbesserung aber ohne anhaltenden Effekt zu sein scheint. Sie wird nach aktuellem Wissensstand nicht für AATM-Patienten empfohlen (55). Eine alternative Methode ist die bronchoskopische Installation von Ventilen (81). Als *Ultima ratio* steht Patienten die Lungentransplantation zur Verfügung.

1.7 Pathophysiologie

1.7.1 Systemische Inflammation

Bei COPD-Patienten und Patienten mit AATM wird davon ausgegangen, dass es aufgrund des hohen oxidativen Stresses in der Lunge und den immer wieder auftretenden Exazerbationen zu einer persistierenden systemischen Inflammation kommt. Die lokalen entzündlichen Prozesse und Zytokine sind dabei die Verursacher der häufigen systemischen Begleiterkrankungen (245,252). Die Patienten präsentieren sich mit Problemen wie Osteoporose, Gewichtsverlust, kardiovaskulären Begleiterkrankungen, Depressionen und Angst, welche entscheidenden Einfluss auf die weitere Lebenserwartung haben (110,254). Als weitere Ursache wird die, mit fortschreitendem Lungenemphysem zunehmende, physische Inaktivität gesehen (89). Ausdruck der systemischen Inflammation ist die Hochregulation von Markern wie TNF- α , IL-8 und Akute-Phase-Proteinen in stabilen COPD-Patienten. Häufig zeigen Patienten einen Verlust an Muskelmasse der auf die erhöhten TNF- α -Spiegel zurückzuführen ist, die auch im Sputum von COPD-Patienten zu finden sind (21,87,240). Erschwerend kommt bei AATM-Patienten hinzu, dass sie auf den erhöhten Stress, anders als COPD-Patienten, nicht mit einer Hochregulation des Akute-Phase-Proteins AAT reagieren können. Bei Entzündungen wird die Serum-Konzentration normalerweise um min. 25 Prozent angehoben (80). Bei den systemischen Prozessen sind die PMNs zentraler Bestandteil der Inflammation. In der pulmonalen Mikrovaskulatur werden die zahlreichen PMNs als Verursacher für die im Plasma erhöhten oxidativen Stressmarker angesehen (195,252). Zusätzlich zeigen sie in dem oxidativen Milieu eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (168). Bei der Aktivierung von PMNs werden unter anderem Myeloperoxidase (MPO) und MMP-9 freigesetzt. Erhöhte Serumwerte dieser biologischen Marker kennzeichnen die systemische Inflammation (28,246).

1.7.2 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten, Matrix-Metalloproteinase-9 und Interleukin-8

Die PMNs spielen im Umbauprozess der Lunge als Dreh- und Wendepunkt der Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle. Insbesondere bei AATM-Patienten mit

erniedrigter FEV₁ werden erhöhte Zahlen von PMNs und eine erhöhte Aktivität der neutrophilen Elastase in Bronchiallavagen gemessen (200). Bei PI*MM Trägern besteht ein ausgewogenes Verhältnis der NE-AAT Homöostase, die Wirkung von AAT ist abhängig von der Konzentration im Blut (45). Zusätzlich fungiert es als Akute-Phase-Protein bei der Regulation von Entzündungen. M-AAT hat einen normalisierenden Einfluss auf die Aktivität und Chemotaxis von aktivierten PMNs, z. B. durch das Binden von freiem IL-8 und der Herabregulation von TNF- α (7,19,20,218). Al-Omari und Kollegen können zeigen, dass M-AAT die Adhäsion der PMNs reduziert und die Ausschüttung von IL-8 stark hemmt. Als polymerisiertes Z-AAT kann es, wie oben beschrieben, chemotaktisch wirken (2). IL-8 wird, anders als MMP-9 und MPO, nur in geringem Maße von PMNs gespeichert. Nach Aktivierung, z. B. durch LPS, erfolgt meist die *de novo* Synthese und Sekretion (233). Weiterführend kann eine neue Studie von Hurley *et al.* zeigen, dass PMNs von Pi*ZZ Patienten *per se* ein verändertes Verhalten aufzeigen. Bedingt durch den erhöhten ER-Stress im Rahmen der intrazellulären Z-AAT-Akkumulation ist zum einen die Apoptoserate der PMNs erhöht, zum anderen scheint auch das zelluläre, anti-bakterielle Abwehrverhalten durch eine veränderte TNF- α Signalgebung herabgesetzt zu sein. Die Inkubation mit M-AAT führt wiederum zu einer Herabsetzung der erhöhten Apoptoserate und einer Normalisierung des anti-bakteriellen Abwehrverhaltens (101).

Neben der NE sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) in Zusammenhang mit PMNs und der Entwicklung eines Lungenemphysems in den Fokus der Forschung gerückt. Die sezernierten Proenzyme der MMPs müssen durch Proteasen, z. B. durch die NE, aktiviert werden (52). Wie die Elastase, sind die MMPs für die Degradation und den Umbau der extrazellulären Matrix (EZM), insbesondere von Elastin, verantwortlich (211). Die MMP-9, auch Typ 4 Kollagenase oder Gelatinase B, wird unter anderem von PMNs in tertiären Granula produziert, gespeichert und freigesetzt (41). Beim AATM ist sie, pathophysiologisch vergleichbar mit der NE, am emphysematischen Umbau der Lunge und der systemischen Entzündungsreaktion beteiligt. Die Wechselwirkung mit der Protease-Antiprotease-Kaskade besteht also nicht nur in der Aktivierung durch die NE. MMP-9 kann AAT durch Spaltung inaktivieren und den Aufbau eines gewebsschädigenden Milieus fördern. Zusätzlich wird der natürliche Inhibitor der

MMP-9, der *Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinase-1* (TIMP-1), durch die NE inaktiviert (9). Im Gegensatz dazu können Higashimoto und Kollegen keine Differenzen der FEV₁/FVC-Werte auf Basis erhöhter MMP-9 Serumwerte zwischen COPD-Patienten, Asthmatikern und einer gesunden Kontrollgruppe feststellen (92). Cataldo *et al.* können in ihren Untersuchungen keine abnormale MMP-9 Sekretion durch PMNs im Gruppenvergleich zwischen COPD Patienten, Asthmatikern und einer gesunden Kontrollgruppe messen (40).

1.7.3 Myeloperoxidasen und die Oxidation von α 1-Antitrypsin

Eine zunehmende Bedeutung bei der systemischen Inflammation und der Inaktivierung des Inhibitors AAT mittels Oxidation wird der MPO zugesprochen. Die 150 kDa schwere Häm-Peroxidase wird von Vorläuferzellen im Promyelozytenstadium produziert. Ausdifferenzierte PMNs speichern sie in primären, azurophilen Granula zusammen mit NE, Proteinase-3 und Cathepsin G (95). MPOs binden nach ihrer Freisetzung an negativ-geladene Strukturen, wie z. B. die EZM oder zelluläre Membranen. Dort generieren sie reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) wie Wasserstoffperoxid und Chlorine zur antimikrobiellen Abwehr und dem Abbau von Gewebe (238). Die Degranulation von MPOs durch PMNs lässt ein entzündliches, hoch-oxidatives Milieu entstehen, das unspezifisch Proteine, darunter auch AAT, oxidiert und damit ihre Funktion beeinträchtigen kann (35,157). MPO-defiziente PMNs sind hingegen nicht in der Lage AAT zu oxidieren bzw. zu inaktivieren (44). AAT verliert durch die Oxidation (oxAAT) seine Fähigkeit zur Inhibition der NE, was wiederum die fortschreitenden Degradation der Lunge unterstützt (230). In einer zystischen Fibrose-Studie von Cantin *et al.* kann gezeigt werden, dass erhöhtes Sputum-oxAAT auch auf die Reaktion mit MPO-Oxidanzien zurückzuführen ist (33). Immunmodulierende Funktionen der MPO bestehen zum einen in der inflammatorischen Wirkung auf Endothelzellen in Form einer IL-6, IL-8 und TNF- α Freisetzung. Zum anderen wird die Freisetzung von TNF- α und Interferon- γ (IFN- γ) aus Makrophagen induziert und damit die Aufrechterhaltung chronischer Entzündungsprozesse gefördert (130,131,253). Auch klinische Studien weisen auf eine Rolle der MPO bei Patienten mit Lungenemphysem hin. Insgesamt ist der lokale und

systemische oxidative Stress bei COPD Patienten gegenüber gesunden Kontrollen deutlich erhöht (255).

Die oben beschriebene Oxidation von AAT, mitverursacht durch die aus MPO-Produkten und aus Noxen entstehenden ROS, und der daraus resultierende Verlust der Inhibition ist seit Längerem in der Literatur bekannt und diskutiert (109). Maßgeblich für den Funktionsverlust ist die Oxidation zweier besonders anfälliger Methioninreste im funktionellen Zentrum des Proteins und der Entstehung detektierbarer Methioninsulfoxidreste (115,230). Die Oxidation führt über eine verminderte Assoziationsrate zwischen Protein und Protease zu einem Aktivitätsverlust von AAT. Der Komplex zwischen oxAAT und NE ist wesentlich instabiler (178). Durch die instabilere Komplexbildung verlängert sich die relative Halbwertszeit der zu inhibierenden Protease um mehr als den Faktor 2 000. Entsprechend ist eine erheblich längere und umfassendere Degradation des umgebenden Gewebes möglich (14,229). Vom Verlust der Anti-Elastase-Funktion abgesehen, kann in einer weiteren Studie von Janciauskiene *et al.* gezeigt werden, dass die Induktion zur Freisetzung von anti-inflammatorischem IL-10 durch oxAAT nicht beeinträchtigt ist (105). Die genaue Pathophysiologie von oxAAT und Wirkung auf Zellebene konnte bisher nicht hinreichend erklärt werden.

1.8 Fragestellung & Ziele der Dissertation

Die AAT-Substitutionstherapie ist seit über 25 Jahren für AATM-Patienten mit fortgeschrittenem Lungenemphysem verfügbar. Trotz eines umfangreichen Wissens um die Pathogenese der Krankheit, dem Aufbau und der Funktion des Proteins ist weitgehend ungeklärt, warum die Substitutionstherapie keinen permanenten Effekt auf die Verlangsamung der Lungendestruktion ausübt. Es bleibt weiterhin unklar, ob neben den gesicherten, anti-elastatischen Effekten des AATs weitere immunologische Prozesse auf Zellebene stattfinden, die diesem positiven Effekt entgegenwirken. In einer kürzlich veröffentlichten Studie quantifizierten wir die Plasmaspiegel von AAT-Polymeren, Zytokinen und Chemokinen bei Patienten mit Substitutionstherapie kurz vor, zwei Stunden nach und drei Tage nach AAT-Infusion (Prolastin®). Hier

konnten wir signifikante Fluktuationen der Zytokinspiegel und AAT-Polymerkonzentrationen beobachten. Diese Erkenntnisse weisen auf bisher nicht bekannte, immunologische Prozesse hin, die in direktem Zusammenhang mit der Substitutionstherapie stehen müssen. Bisherige Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit den Auswirkungen der Substitutionstherapie über sehr kurzfristige oder sehr große Zeiträume und geben keinen Aufschluss über die Prozesse, die auf Ebene der PMNs zwischen den wöchentlichen Infusionen ablaufen.

Der Fokus der Dissertation liegt auf der Untersuchung und zeitlichen Nachverfolgung der Effekte der AAT-Substitutionstherapie auf die PMNs. Im Umkehrschluss sollen die Auswirkungen des hohen generierten, inflammatorischen Potentials auf das infundierte AAT beobachtet werden. Die nachfolgenden Untersuchungen beziehen sich auf substituierte Patienten. Diese werden in der Analyse mit nicht-substituierten Patienten und gesunden Probanden verglichen. Die Ziele der Studie sind wie folgt:

In vivo

1. Die Untersuchung der Aktivierung und Degranulation der PMNs und der damit assoziierten Veränderungen von AAT nach der Infusion in Form von Komplexierungen und Degradierungen
2. Die Beobachtung der Fluktuation der bisher untersuchten Marker durch exemplarische Beobachtung im Wochenverlauf

Ex vivo

3. Die Beobachtung infusionsbedingter Unterschiede der PMNs auf Stimuli gemessen anhand von Degranulationsmarkern (MMP-9, MPO, IL-8)

Wir erwarten in dieser Studie die kurzfristigen systemischen Auswirkungen der Substitutionstherapie auf PMNs und die Proteinmodifikation von AAT beobachten zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsablauf

Alle Patienten bzw. gesunden Probanden erschienen vormittags zur Blutentnahme und Ganzkörperplethysmographie, bzw. zur Infusion von AAT (Prolastin®, Grifols) im Falle der substituierten Patienten. Bei substituierten Patienten erfolgte kurz vor Infusion sowie zwei Stunden nach Beendigung der Infusionstherapie (Dauer min. 1 Stunde) eine einmalige Probengewinnung in Form einer Blutentnahme (zwei Serum-Röhrchen à 4,9 ml, sechs Citratblut-Röhrchen à 10 ml, ein EDTA-Röhrchen à 2,7 ml, alle Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland). Die substituierten Patienten der Gruppe 1, deren Proben zur Serumanalyse herangezogen wurden (Tabelle 3) erschienen zusätzlich drei Tage nach ihrer Substitution mit AAT.

Der substituierte Patient von Gruppe 2 (Wochenverlauf, Tabelle 4) erschien an Tag 1 sowie Tag 8 zur Infusion von Prolastin®. Die restlichen Probenentnahmen innerhalb der Woche erfolgten ebenfalls vormittags.

Vor Beginn der Studie beantworteten alle Studienteilnehmer einen Erfassungsbogen mit Angabe ihres Raucherstatus, der aktuellen Medikation, Vorerkrankungen und der Behandlung. Ziel war es, eine akute Exazerbation oder die Einnahme interferierender Medikamente auszuschließen; zusätzlich wurden zu deren Ausschluss akute Entzündungsparameter (IL-6, IL-8, Procalcitonin, CRP) im Labor bestimmt. Jeder Teilnehmer erhielt bei Rekrutierung eine Probandeninformation und erklärte sich in Form einer Einverständniserklärung zur Teilnahme bereit. Alle Studien wurden durch die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg bewilligt (Gruppe 1: Antrag Nr. 59/06; Gruppen 2 & 3: Antrag Nr. 148/12).

2.2 Labormethoden

2.2.1 Nephelometrische α 1-Antitrypsin -Konzentrations-Messungen

Für die Bestimmung der AAT-Konzentration in den Probandenseren wurde die Routinelabormessung mittels Nephelometrie (Behring Nephelometer 2 BN2, Siemens, Eschborn, Deutschland) des Universitätsklinikums Marburg genutzt.

2.2.2 Herstellung von chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin

Die Herstellung von chemisch oxidiertem AAT erfolgte nach einem etablierten Verfahren mit N-Chlorosuccinimid (NCS) (136). Ausgangsform des Oxidationsprozesses war Prolastin® (Grifols, Barcelona, Spanien) als Standardinfusion der substituierten Patienten. Zur Herstellung einer 10 mM Oxidations-Lösung wurden 0,1335 g NCS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in 100 ml 0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH = 8,0) aufgenommen und zur Lösung gebracht; bei anschließender Verwendung auf Zellen erfolgte die vorherige Sterilfiltration mittels Vakuumfilter (Sarstedt AG&Co.).

Für die Oxidation von 100 mg AAT wurden 4 ml der 25 mg/ml konzentrierten Prolastin®-Lösung im Falconröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit 4,8 ml der 10 mM NCS-Lösung für 60 min, 21 °C auf dem Mischroller (IDL GmbH, Nidderau, Deutschland) inkubiert. Zur Re-Konzentrierung wurde das entstandene Oxidationsgemisch in eine 30 kDa Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (EMD Millipore, Darmstadt, Deutschland) pipettiert und bei 4 000 rpm für 40 min zentrifugiert (Rotina 380R, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Der entstandene Überstand mit konzentriertem oxAATc (chemisch oxidiertes α 1-Antitrypsin) wurde in 9,5 ml PBS (Sigma Aldrich) aufgenommen. Zur Kontrolle wurde die NCS-Oxidationslösung (oxAATc-Kontrolle) in gleicher Weise verdünnt und aufgenommen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des entstandenen oxAATc wurde ein BCA-Test (Sigma Aldrich) angeschlossen. Hier wurde nach dem technischen Merkblatt der Herstellerfirma vorgegangen. Für die Standardreihe wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung im Detektionsbereich von 200-1 000 μ g/ml auf einer F96 Maxisorp Immunoplate (Nunc, Langenselbold, Deutschland) angelegt.

Die Proteinproben wurden, jeweils in Doppelbestimmung, in unterschiedlichen Konzentrationsreihen (1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50) á 25 µl aufpipettiert. In jede Vertiefung wurde eine Reaktionslösung von 200 µl hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte mit einem Spektrophotometer (Infinite F200 Pro Reader, Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Der Oxidationsprozess wurde im Anschluss mittels eines NE-Enzymassays sowie dem Nachweis der aufgehobenen Komplexbildung mit der NE in einer Sodium–Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) *Western Blot* verifiziert (105,230). Für den Enzymassay wurden 3 µl der humanen NE (Sigma Aldrich), in einer Konzentration von 0,1 mg/ml, mit 107,6 µl der Testsubstanzen im molaren Verhältnis 1 : 2 mit oxAAT bzw. Prolastin® für 30 min bei 37 °C inkubiert. Prolastin® (c = 25 mg/ml) wurde im Voraus 1 : 2500, oxAAT (c = 10 mg/ml) 1 : 1 000 mit PBS verdünnt. Das Elastase-Testsubstanzgemisch wurde auf einer F96 Mikrotiter Platte in Doppelbestimmung auspipettiert und 100 µl der 0,4 mM N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide-Substratlösung (Sigma Aldrich), welche zuvor mit 0,1 M Tris 0,5 M NaCl-Puffer (pH = 7,5) verdünnt wurde, kurz vor Messbeginn zugegeben. Die nachfolgende Messung im Spektrophotometer erfolgte für 60 min bei einer Wellenlänge von 406 nm. Alle Messungen wurden unabhängig voneinander in drei Experimenten (Abbildung 15).

Zum Nachweis der aufgehobenen Komplexbildung von oxAATc mit Elastase wurde eine 12,5 % (w/v) SDS-PAGE (2.2.4) mit Coomassie Färbung nach einem Protokoll von Li *et al.* durchgeführt (136). AAT (Prolastin®) und oxAATc wurden hierfür im molaren Verhältnis von 2 : 1 mit porciner Pankreaselastase (Sigma Aldrich) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde jede Tasche mit Probenpuffer (Bio Rad), 2,5 µg Pankreaselastase sowie 10 µg Prolastin® respektive 10 µg oxAATc, jeweils mit und ohne Pankreaselastase, beladen. Die Gele liefen für 30 min bei 0,03 A/Gel. Im Anschluss wurden die Gele in Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio Rad) über Nacht angefärbt (Abbildung 16).

2.2.3 Myeloperoxidase, Matrix-Metalloproteinase-9 und Interleukin-8 ELISA

Die im Serum durchgeführten Messungen von MPO und MMP-9 wurden mit Hilfe eines DuoSet *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *Development Kits* für humane MPO bzw. MMP-9 (R&D Systems Europe, Abingdon, UK) durchgeführt.

2.2.3.1 Myeloperoxidase

Im Falle von MPO wurde der primäre Erfassungs-Antikörper (anti-humaner Ratten-MPO-Antikörper, Part 842842) in einer Konzentration von 4 µg/ml aufgenommen, der MPO-Detektions-Antikörper (anti-humaner Ziegen-Antikörper, Part 842843) in einer Konzentration von 400 ng/ml, die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Part 890803) wurde, ausgehend von der Startlösung, 1 : 200 verdünnt. Jede Verdünnung wurden mit einer Verdünnungslösung (1 % Bovines Serum-Albumin (BSA) in PBS, pH 7,2-7,4) durchgeführt. Der Messstandard wurde mittels siebenfacher Standardkurve erstellt (Messbereich 62,5 – 4 000 pg/ml, Part 842844).

Vor Beginn des Assays wurde eine 96-Mikrotiter-Platte (F96 Maxisorp Immunoplate Nunc) mit je 100 µl/ Vertiefung des Erfassungs-Antikörpers ausplattiert, versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag abgenommen und dreifach mit je 400 µl Waschpuffer (0,05 % Tween® 20 in PBS, pH 7,2-7,4) durch einen Autowascher (Hydroflex, Tecan) gewaschen, nach dem letzten Waschschrift wurde die 96-Mikrotiter Platte durch Ausschlagen auf Papiertücher von Flüssigkeitsresten befreit. Im Anschluss wurde die Platte mit je 300 µl/Vertiefung Verdünnungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert und erneut dreifach gewaschen (s.o.). Für den Serum-ELISA wurden die Patientenseren mit der Verdünnungslösung 1 : 500, für die PMN-Überstände 1 : 500 - 1 : 1 000 verdünnt. 100 µl der Proben und Standards wurden im Anschluss in Doppelbestimmung auf die 96-Mikrotiter Platte aufgetragen und nach Versiegelung für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, es folgte der dreifache Waschschrift (s.o.). Es folgte eine Zugabe von 100 µl Detektionsantikörper pro Vertiefung und einer erneuten Inkubation von 2 Stunden und erneut der dreifache Waschschrift (s.o.). Unter Ausschluss von direktem Licht wurden 100 µl der Meerrettich-Peroxidase je Vertiefung hinzugefügt

und für 20 min inkubiert mit direktem Anschluss der Waschschr tte (s.o.). Zur Messung wurden 100 µl der Substratlösung (Farbreagenz aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin im Verhältnis 1 : 1) pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mittels 50 µl einer Stopplösung (2 N H₂SO₄) beendet. Die Messung erfolgte im Spektrophotometer (Infinite F200 Pro Reader, Tecan) bei einer Absorption von 540 nm.

2.2.3.2 Matrix-Metalloproteinase-9

Für den MMP-9-ELISA wurde der primäre Erfassungs-Antikörper (anti-humaner Maus-MPO-Antikörper, Part 841028) in einer Konzentration von 1 µg/ml aufgenommen, der MMP-9 Detektions-Antikörper (anti-humaner Ziegen-Antikörper, Part 841029) in einer Konzentration von 300 ng/ml. Die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Part 890803) wurde, ausgehend von der Startlösung mit einer Verdünnungslösung (1 % BSA in PBS, pH 7,2-7,4) verdünnt. Restliche Verdünnungen fanden in PBS statt. Der Messstandard wurde mit einer siebenfachen Standardkurve erstellt (Messbereich 31,2–2 000 pg/ml, Part 841030).

Vor Beginn des Assays wurde eine 96-Mikrotiter-Platte (F96 Maxisorp Immunoplate Nunc) mit je 100 µl/Vertiefung des Erfassungs-Antikörpers ausplattiert, versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag abgenommen und dreifach mit je 300 µl Waschpuffer (0,05 % Tween® 20 in PBS, pH 7,2-7,4) durch einen Autowascher (Hydroflex, Tecan) gewaschen. Nach dem letzten Waschschr tt wurde die 96-Mikrotiter Platte durch Ausschlagen auf Papiertücher von Flüssigkeitsresten befreit. Im Anschluss wurde die Platte mit je 300 µl/Vertiefung Verdünnungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert und erneut dreifach gewaschen (s.o.). Für den Serum-ELISA wurden die Patientenserum mit der Verdünnungslösung 1 : 1 000, für die PMN-Überstände 1 : 50 - 1 : 1 000 verdünnt. 100 µl der Proben und Standards wurden im Anschluss in Doppelbestimmung auf die 96-Mikrotiter Platte aufgetragen und nach Versiegelung für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte der dreifache Waschschr tt (s.o.). Es folgte eine Zugabe von 100 µl Detektionsantikörper mit Zusatz von normalem Ziegenserum

(DY005) pro Vertiefung und einer erneuten Inkubation von 2 Stunden und erneut der dreifache Waschschrift (s.o.). Unter Ausschluss von direktem Licht wurden 100 µl der Meerrettich-Peroxidase je Vertiefung hinzugefügt und für 20 min inkubiert mit direktem Anschluss der Waschschrift (s.o.). Zur Messung wurden 100 µl der Substratlösung (Farbreagenz aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin im Verhältnis 1 : 1) pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mittels 50 µl einer Stopplösung (2 N H_2SO_4) beendet. Die Messung erfolgte im Spektrophotometer (Infinite F200 Pro Reader, Tecan) bei einer Absorption von 540 nm.

2.2.3.3 Interleukin-8

Für den IL-8 ELISA wurde der primäre Erfassungs-Antikörper (anti-humaner Maus-IL-8-Antikörper, Part 890804) in einer Konzentration von 4 µg/ml aufgenommen, der IL-8-Detektions-Antikörper (anti-humaner Ziegen-Antikörper, Part 890805) in einer Konzentration von 20 ng/ml, die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Part 890803) wurde, ausgehend von der Startlösung, nach Herstellerangaben verdünnt. Jegliche Verdünnungen wurden mit einer Verdünnungslösung (0,1 % BSA, 0,05 % Tween® 20 in 20 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, pH 7,2-7,4) durchgeführt. Der Messstandard wurde mit einer siebenfachen Standardkurve erstellt (Messbereich 32,2–2 000 pg/ml, Part 890806). Vor Beginn des Assays wurde eine 96-Mikrotiter-Platte (F96 Maxisorp Immunoplate Nunc) mit je 100 µl/ Vertiefung des Erfassungs-Antikörpers ausplattiert, versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag abgenommen und dreifach mit je 400 µl Waschpuffer (0,05 % Tween® 20 in PBS, pH 7,2-7,4) durch einen Autowascher (Hydroflex, Tecan).gewaschen, nach dem letzten Waschschrift wurde die 96-Mikrotiter Platte durch Ausschlagen auf Papiertücher von Flüssigkeitsresten befreit. Im Anschluss wurde die Platte mit je 300 µl/Vertiefung Verdünnungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert und erneut dreifach gewaschen (s.o.). Für den IL-8 ELISA wurden die PMN-Überstände nicht verdünnt. 100 µl der Proben und Standards wurden im Anschluss in Doppelbestimmung auf die 96-Mikrotitrier Platte aufgetragen und nach Versiegelung für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte der dreifache Waschschrift (s.o.). Es folgte eine

Zugabe von 100 µl Detektionsantikörper pro Vertiefung und einer erneuten Inkubation von 2 Stunden und erneut der dreifache Waschschrift (s.o.). Unter Ausschluss von direktem Licht wurden 100 µl der Meerrettich-Peroxidase je Vertiefung hinzugefügt und für 20 min inkubiert mit direktem Anschluss der Waschschriffe (s.o.). Zur Messung wurden 100 µl der Substratlösung (Farbreagenz aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin im Verhältnis 1 : 1) pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mittels 50 µl einer Stopplösung (2 N H_2SO_4) beendet. Die Messung erfolgte im Spektrophotometer (Infinite F200 Pro Reader, Tecan) bei einer Absorption von 540 nm.

2.2.4 SDS-PAGE und Western Blot

Die Quantifizierungen für monomeres AAT und oxidiertes AAT fanden in 7,5 % (w/v) SDS-PAGE Trenngelen, die Quantifizierung des komplexierten AATs in nativen Trenngelen statt. Für ein 7,5 % (w/v) SDS-PAGE Trenngel wurden 3,4 ml eines 1,0 M Tris-HCl Puffers (pH 8,8), 225 µl einer 50 % (v/v) Glycerin-Lösung (Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland), 2,25 ml einer 30 % (v/v) Acrylamid Lösung, 90 µl einer 10 % (w/v) SDS Lösung, 45 µl einer 10 % (w/v) Ammonium Persulfat-Lösung (APS), 9 µl einer Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin-(TEMED)-Lösung (alle Sigma Aldrich) und 3 ml H_2O (Millipore BioPak® Anlage, EMD Millipore) angesetzt. Für das Sammelgel wurden 600 µl einer 0,5M Tris-HCl (pH = 6,8), 400 µl einer 30 % (v/v) Acrylamid Lösung, 24 µl einer 10 % (w/v) SDS Lösung, 1 400 µl H_2O , 12 µl einer 10 % (w/v) APS-Lösung und 2,4 µl einer TEMED-Lösung angesetzt. Der Gel-Gießstand, die Gelelektrophorese-Kammer (Mini Protean Tetra Cell) sowie der vollständige nachfolgende Halbtrocken-Transfer-*Blot* (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell) fanden in einem System von Bio-Rad statt (Bio-Rad Laboratories GmbH). Das Trenngel wurde vor Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, nach Polymerisation wieder abgeschüttet, das Sammelgel aufgeschichtet und Gelkämme eingesteckt. Für 5 ml Lämmli-Probenpuffer wurden 1 ml 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8), 2 ml 50 % (v/v) Glycerin, 2 ml 10 % (w/v) SDS und 1 mg Bromphenolblau (alle Roth GmbH) angesetzt. Für den Laufpuffer wurden 100 ml eines zehnfachen Ansatzes, bestehend aus 30 g Tris, 144g Glycin in 1000 ml H_2O a.d., mit 5 ml 20 % (w/v) SDS-Lösung auf 1 000 ml H_2O a.d. aufgefüllt. Der SDS Halbtrocken-

Puffer wurde mit 11,6 g Tris Base, 5,8 g Glycin, 0,8 g SDS und 400 ml Ethanol (alle Roth GmbH & Co.) angesetzt und auf 2 000 ml mit H₂O a.d. aufgefüllt.

Die Serumproben für den AAT-*Western-Blot* wurden im Verhältnis 1 : 1 000, die Proben für den Anteil oxidierten AATs im Verhältnis 1 : 500 verdünnt. Für die SDS-PAGE wurden 10 µl Probe mit 10 µl Probenpuffer und 3 µl Mercaptoethanol (Sigma Aldrich) für 10 min aufgeköcht (BT 130-1, Ditabis-HLC, Pforzheim, Deutschland), auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (Spectrafuge™ Mini Centrifuge, Labnet International, Inc., NJ, USA). Entsprechend wurden 10 µl Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, Bio-Rad Laboratories GmbH) benutzt. Die Gelkammern wurden anschließend mit den Proben und dem Proteinstandard beladen, in das Gelelektrophorese-Kammer eingespannt, das System mit Laufpuffer gefüllt und bei Laufbedingungen von 0,03 A pro Gel und ca. 1 Stunde Laufzeit gestartet.

Vor dem *Blotten* wurde die PVDF Membran (Immun-Blot PVDF, Bio-Rad Laboratories GmbH) zurechtgeschnitten und 1 min in Methanol (Roth GmbH & Co.) aktiviert sowie anschließend in Halbtrockenpuffer äquilibriert. Im Halbtrocken-Transfer-*Blotter* wurden je drei, vorher in Halbtrockenpuffer lagernde, Whatman-Papiere (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad Laboratories GmbH) auf der anodischen Seite und kathodischen Seite mit dazwischenliegender PVDF (anodische Seite) und dem Gel (kathodische Seite) positioniert. Das *Blotten* fand im Anschluss bei einer Stromstärke von 0,08 A für min. 1 Stunde statt. Nachfolgend wurde die Membran in 30 ml Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (TBST) und 3 % (w/v) Milchpulver für 20 min blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte ebenfalls in 30 ml TBST und 3 % (w/v) Milchpulver bei 4 °C über Nacht. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang für je 10 min in 15 ml TBST. Der sekundäre Antikörper inkubierte in 15 ml TBST und 3 % (w/v) Milchpulver für 1 Stunde. Folgende primäre und dazugehörige sekundäre Antikörper wurden benutzt:

AAT-Antikörper Primär: 5 µl polyklonaler Ziegen-Antikörper (A180-122A, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA; Verdünnung 1 : 10 000). Sekundär: 1,5 µl Anti-Ziegen-Antikörper (A5420, Sigma Aldrich; Verdünnung 1 : 20 000).

Anti-Methionin-Sulfoxid-Antikörper Primär: 5 µl polyklonaler Hasen-Antikörper (AB85396, abcam, Cambridge, UK; Verdünnung 1 : 2 000). Sekundär: 1,5 µl polyklonaler Anti-Hasen-Antikörper (AB6829; Verdünnung 1 : 20 000).

Nach dem sekundären Antikörper wurde der dreifache Waschschrift (s.o.) wiederholt und es erfolgte der Chemilumineszenz-(ECL)-Nachweis (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) nach Herstellerprotokoll. Die Detektion mit einem Chemilumineszenz Imager (Intas Science Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland) statt. Die anschließende Quantifizierung erfolgte mittels einer 1D Gel Analyse Software (Intas Science Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland).

2.2.5 Isolation von polymorph-nukleären Granulozyten

Die Gewinnung der PMNs aus dem Citratblut (S-Monovette, Sarstedt AG&Co.) der Probanden erfolgte anhand eines Dichtegradienten (Polymorphprep™, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen). Das Citratblut wurde nach Entnahme für 20 min auf dem Roller inkubiert, anschließend auf 12,5 ml Polymorphprep™ in einem Falconröhrchen (Greiner Bio-One) aufgeschichtet und bei Raumtemperatur (RT) und 1 600 rpm für 35 min zentrifugiert (Rotina 380R, Hettich GmbH). Die oberste Schicht, inklusive der Monozyten, wurde mittels steriler Plastikpasteurpipette abgenommen und verworfen. Die nachfolgende Schicht, mit enthaltenen PMNs, wurde vorsichtig mit einer Plastikpasteurpipette abgenommen und in ein weiteres Falconröhrchen übertragen. Nachfolgend wurden die PMNs mit PBS (Sigma Aldrich) auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min, bei 1 600 rpm und Raumtemperatur, abzentrifugiert. Die verbliebenen Erythrozyten wurden durch Zugabe von 14 ml 0,2 % (w/v) NaCl Lösung für 20 sec lysiert und im Anschluss wieder mit 14 ml einer 1,6 % (w/v) NaCl Lösung isotonisiert und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde bei hoher Erythrozytenkontamination wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Die PMNs wurden anschließend, abhängig vom weiteren Vorgehen, in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in *Roswell Park Memorial Institute*-Medium (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) unter Zusatz von 1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin und 10 %

(w/v) Kälberserum (FCS) resuspendiert. Die Reinheit und Zellvitalität der PMNs wurde anhand von Zytospins und einer Trypanblau-Färbung bestimmt und lag bei > 95 %.

2.2.6 Stimulation der polymorph-nukleären Granulozyten im Zellkulturüberstand

Für die spätere Messung der Biomarker der systemischen Inflammation wurden die PMNs im Medium stimuliert. In einer 12er Vertiefungs Zellkulturplatte (Corning Costar 12-well Cell Culture Tissue Culture Treated Plate, Sigma Aldrich) wurden die PMNs in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen in 900 µl in Doppelbestimmung ausplattiert. Stimuliert wurde je mit 100 µl RPMI, 40 µl Prolastin® (c = 25 mg/ml), 100 µl oxAATc (c = 10 mg/ml), 100 µl oxAATc Kontrolle, 10 µl LPS (c = 0,01 mg/ml) und 100 µl PMA (beides von Sigma Aldrich). Falls notwendig, wurde auf 1 000 µl/Vertiefung mit RPMI-Medium aufgefüllt. Die PMNs wurden im Anschluss für 240 min inkubiert, bei 700 rpm abzentrifugiert und vom überstehenden Zellkulturmedium 800 µl abgenommen und bei -80 °C für die spätere Analyse weggefroren.

2.2.7 Neutrophile Adhäsion

Die Adhäsion der PMNs (siehe 3.4.2) erfolgte in einer 96-Mikrotiter Zellkulturplatte (Corning Incorporated, NY, USA) die zuvor mit humanem Fibronectin (Vorhaut-Fibroblasten-Fibronectin, Sigma Aldrich) beschichtet wurde. Die Beschichtung erfolgte unter Zugabe von 50 µl Fibronectin (c = 20 µg/ml) für die Dauer von 12 Stunden bei 37 °C. Vor Beginn des Adhäsions-Experiments nach Howard wurde die Fibronectinlösung abgesaugt (97). Alle Vertiefungen wurden zweifach mit je 50 µl PBS (Sigma Aldrich) gewaschen und anschließend die Platte mit je 200 µl PBS unter Zusatz von 1 mM $MgCl_2$ sowie 2 % (w/v) BSA für 45 - 60 min bei 21 °C blockiert. Der Blockierungspuffer wurde erst kurz vor Beginn des Adhäsions-Experiments entfernt.

Die zuvor isolierten PMNs wurden in einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 4 ml RPMI (PAA Laboratories) unter Zusatz von 0,1 % (v/v) humanem AB-Serum (PAA Laboratories) in einem Falconröhrchen (Greiner Bio-One) aufgenommen. Danach erfolgte das Markieren der PMNs mittels Zugabe von 4 µg/ml Calcein AM (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 25 min bei 37 °C. Nach Markierung

wurden die Zellen dreimalig abzentrifugiert (1 600 rpm, 21 °C) und in PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen, nach erneutem Abzentrifugieren, in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in RPMI 1640 (PAA Laboratories) unter Zusatz von 0,1 % (v/v) humanem AB-Serum (PAA Laboratories) aufgenommen. Auf der 96-Mikrotiter Platte wurden zeitgleich, jeweils in dreifacher Bestimmung, die Stimulationen vorgelegt: 50 µl RPMI, 10 µl Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP; $c = 100$ nM) (Sigma Aldrich), 10 µl Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 500nM, Sigma Aldrich), 20 µl Prolastin® ($c = 5$ mg/ml, Grifols), 20 µl oxAATc ($c = 5$ mg/ml), 50 µl oxAATc Kontrolle sowie in Kombination 20 µl Prolastin® und 10 µl PMA, 20 µl oxAATc und 10 µl PMA. Danach wurden je 50 µl der isolierten PMNs zugegeben und anschließend mit RPMI auf 100 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubationszeit von 25 min unter 37 °C. Im Anschluss wurden die nicht-adhären PMNs mittels Pipette aspiriert und die Platte zweimalig mit 200 µl RPMI-Medium gewaschen. Die Fluoreszenzmessung der adhären PMNs erfolgte bei einer Exzitation von 485 nm und Emission von 520 nm im Spektrophotometer (Infinite F200 Pro Reader, Tecan).

2.3 Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe von Prism v.5.03 (Graphpad Inc., La Jolla, CA, USA) analysiert und graphisch dargestellt. Alle Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test, dem D'Agostino und Pearson Omnibus Normalitätstest sowie dem Shapiro-Wilk Normalitätstest auf statistische Normalverteilung getestet. War diese in allen drei Tests gegeben, erfolgte bei gepaarten Stichproben der *Student's* t-Test und bei nicht-gepaarten Stichproben der ungepaarte *Student's* t-Test. Lag keine Normalverteilung vor, wurde bei gepaarten Stichproben der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, bzw. bei ungepaarten Stichproben der Mann-Whitney-Test angewandt. Korrelationen wurden mit Hilfe der Pearson-Moment-Korrelation bei Normalverteilung, respektive dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten bei nicht-parametrischen Daten, errechnet. Bei Messwerten die unterhalb der Nachweisgrenze lagen ($< \text{Minimum}$) wurde ein Wert von $0,5 \cdot$ (untere Nachweisgrenze) angenommen.

Alle nachfolgenden Darstellungen erfolgen mit dem Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Eine statistische Signifikanz wird bei einem 95 % Konfidenzintervall ab einem p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristiken

Tabelle 3. Gruppe 1: Patientencharakteristik der Serumanalysen

Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung (SD) (w = weiblich, m = männlich, FEV₁ *predicted* = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde), PMNs = polymorph-nukleäre Granulozyten, Pre = vor Prolastin®-Infusion, Post = 2 h nach Prolastin®-Infusion, NS = Nicht-Substituiert

Substituiert			Nicht-Substituiert			
			P-Werte		P-Werte	
Alter (SD)	55 (8,5)		52 (8,2)		0,3301	
Geschlecht (w/m)	5/17		4/8			
FEV ₁ in % <i>pred.</i> (SD)	43,5 (15,2)		60,1 (20,2)		0,0135	
Raucher						
aktuell/ehemalig [n]	0/19		1/7			
Packyears						
geraucht (SD)	13,2 (6,7)		15,9 (16)		0,7990	
	Pre	Post	Pre vs. Post		NS vs. Pre	NS vs. Post
Leukozyten						
in G/l (SD)	6,1 (1,1)	6,4 (0,9)	0,0404	7,2 (1,4)	0,0314	0,0996
PMNs in G/l (SD)	3,7 (1,1)	3,8 (1,0)	0,5061	4,4 (1,3)	0,2059	0,1609

Die Studienpopulation die zur Analyse der Patientenserien herangezogen wurde bestand aus 22 Patienten mit AATM mit wöchentlicher Infusionstherapie (Substituiert) sowie zwölf Patienten mit AATM ohne wöchentliche Infusionstherapie (Nicht-Substituiert). In der Gruppe der nicht-substituierten Patienten befand sich ein aktueller Raucher. Bei allen Patienten erfolgte eine nephelometrische Bestimmung der AAT-Konzentration im Serum. Der bei allen Patienten vorhandene PI*ZZ Genotyp war vorher mittels IEF und Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen worden. Die Lungenfunktionsuntersuchung wurde bei allen Patienten im Universitätsklinikum Gießen-Marburg, Standort Marburg mittels Ganzkörperplethysmographie (MasterScreen Body, Jaeger CareFusion GmbH, Kelberg, Deutschland) durchgeführt.

Die untersuchten Gruppen unterschieden sich in mehreren Kategorien bzw. klinischen Parametern. Die anhand der FEV_1 *predicted* gemessene Lungenfunktion der substituierten Patienten war signifikant niedriger als die der Nicht-substituierten [$p = 0,0135$]. Innerhalb der Gruppe der substituierten Patienten konnte eine signifikante Erhöhung der Leukozyten nach Substitution [$p = 0,0404$] beobachtet werden, die Fraktion der PMNs zeigte keine relevanten Unterschiede. Nicht-substituierte Patienten hatten gegenüber Patienten vor Substitution höhere Leukozytenzahlen [$p = 0,0314$].

Tabelle 4. Gruppe 2: Patientencharakteristik der Wochenverläufe

Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung (SD) (FEV_1 *predicted* = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, $DLCOC/VA$ = Transferkoeffizient/ventiliertes Alveolarvolumen)

	Substituiert	Nicht-Substituiert
Alter	52	61
Geschlecht	männlich	männlich
FEV_1 in % <i>pred.</i>	31,0	56,9
$DLCOC/VA$ in %	72,6	52,2
Raucher		
aktuell/ehemalig [n]	0/1	0/0
Packyears geraucht	10	0

Zur Analyse des Wochenverlaufs wurde je ein substituierter, bzw. nicht-substituierter Patient mit AATM eingeladen und für den Zeitraum von acht bzw. sieben Tagen untersucht. Beide Patienten waren vom PI*ZZ-Genotyp und aktuell Nichtraucher.

Tabelle 5. Gruppe 3: Patientencharakteristik der *ex vivo* Stimulation von polymorph-nukleären Granulozyten

Aufgeführt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung (SD) (w = weiblich, m = männlich, FEV₁ *predicted* = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde, DLCOc/VA = Transferkoeffizient/ventiliertes Alveolarvolumen), PMNs = polymorph-nukleäre Granulozyten, Sub. = substituierte Patienten, Pre = vor Prolastin®-Infusion, Post = 2 h nach Prolastin®-Infusion, NS = Nicht-Substituiert, GK = Gesunde Kontrollen

	Substituiert	Nicht-Substituiert	Gesunde Kontrollen	P-Werte		
				Sub. vs. NS	GK vs. Sub	GK vs. NS
Alter	65 (8,8)	49 (12,9)	51 (11,2)	0,0155	0,0184	0,6699
Geschlecht (w/m)	3/5	3/5	5/7			
FEV₁ in % pred. (SD)	51,0 (14,9)	92,1 (35,3)	104,7 (11,2)	0,0132	<0,0001	0,2898
DLCOc/VA in % (SD)	53,2 (18,0)	69,4 (26,4)	94,9 (9,4)	0,1988	<0,0001	0,0094
Raucher aktuell/ehemalig [n]	0/6	0/4	0/4			
Packyears geraucht (SD)	8,9 (6,6)	5,8 (7,3)	4,3 (7,5)	0,3582	0,1736	0,5714

	Substituiert		Nicht-Substituiert	Gesunde Kontrollen		
	Pre	Post				
Leukozyten in G/l (SD)	6,8 (2,8)	6,9 (2,7)	6,4 (1,3)			5,8 (1,3)
PMNs in G/l (SD)	4,6 (2,9)	4,5 (3,0)	4,1 (1,1)			3,3 (0,8)
IL-8 in ng/l (SD)	14,9 (17,6)	9,8 (6,3)	9,1 (6,1)			5,5 (3,2)

P-Werte						
	Pre vs. Post	Pre vs. NS	Post vs. NS	Pre vs. GK	Post vs. GK	NS vs. GK
Leukozyten	0,3125	0,9591	0,4418	0,3349	0,1770	0,2470
PMNs	0,4609	0,8785	0,7984	0,0972	0,1535	0,0604
IL-8	1,0000	0,7911	0,8257	0,0382	0,1061	0,2020

Zur *ex vivo* Analyse neutrophiler Granulozyten wurden zwei Patienten- bzw. eine Probandengruppe eingeladen. Alle substituierten Patienten sowie fünf Patienten der nicht-substituierten Gruppe trugen einen PI*ZZ-Genotyp. Drei Patienten der nicht-substituierten Gruppe hatten einen PI*SZ-Genotyp. In der gesunden Kontrollgruppe fand keine durchgehende Genotyp-Analyse mittels PCR bzw. IEF statt außer die AAT-Serumkonzentration bewegte sich in der nephelometrischen Messung unterhalb der Normkonzentration von 0,8 g/l.

Substituierte Patienten unterschieden sich signifikant im Alter und der FEV₁ *pred.* von Nicht-substituierten [$p = 0,0155$ und $p = 0,0132$], bzw. im Alter, der FEV₁ *pred.* und der DLCOc von den gesunden Kontrollen [$p = 0,0184$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$]. Zusätzlich gab es signifikante Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und nicht-substituierten Patienten in der DLCOc [$p = 0,0094$]. Auf Basis der Leukozyten und PMNs gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Serum IL-8-Werte der substituierten Patienten waren kurz vor Infusion (pre) am höchsten und waren zu diesem Zeitpunkt signifikant höher als die der gesunden Kontrollgruppe [$p = 0,0382$]. Nach Substitution (post) kam es zu einem leichten Abfall. Die IL-8-Werte überschritten in keiner Gruppe bzw. zu keinem Zeitpunkt den Normbereich von 15 ng/l.

3.1.1 Patientenausschluss

Beim Versuch der Neutrophilen Adhäsion der PMNs (siehe 3.4.2) wurde ein Proband der gesunden Kontrollgruppe als Ausreißer ausgeschlossen (Werte $> 2 \cdot SD$).

3.2 Serumanalysen

3.2.1 α 1-Antitrypsin-Konzentration

3.2.1.1 α 1-Antitrypsin-Konzentrationen vor und nach Substitutionstherapie

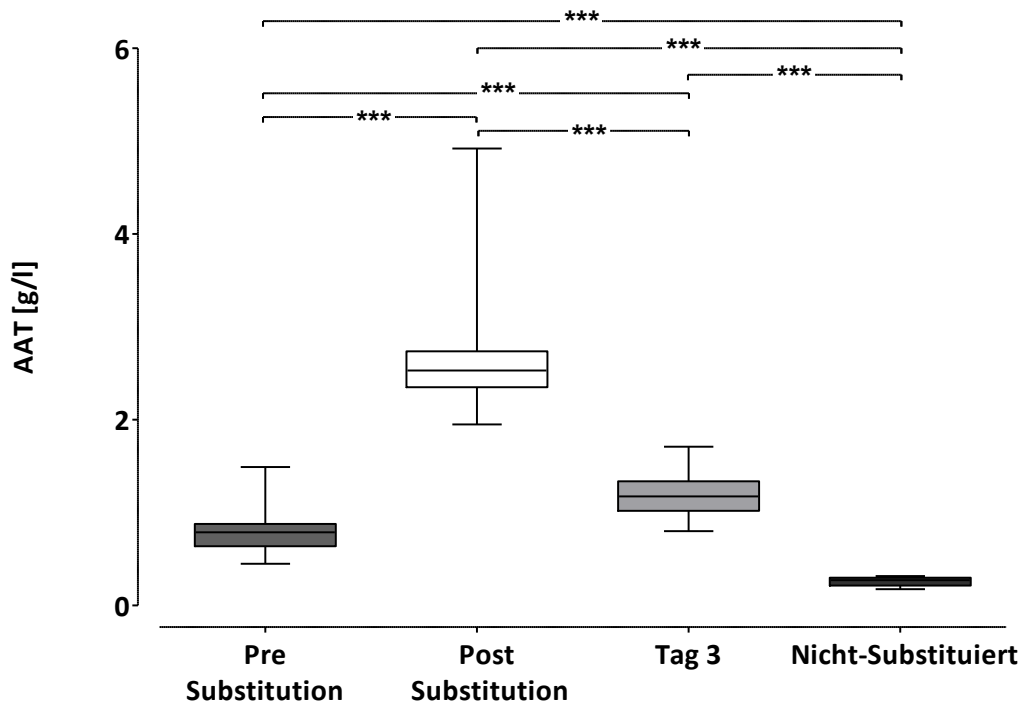


Abbildung 2. α 1-Antitrypsin Konzentrationen von α 1-Antitrypsinmangel-Patienten (PI*ZZ) im Serum

Nephelometrische Bestimmung der AAT-Konzentrationen im Serum der Patienten. Die Serumwerte stiegen nach Infusion von Prolastin® im Vergleich zu vor der Substitution signifikant an und fielen am dritten Tag nach der Substitution ab. Nicht-substituierte Patienten lagen mit der Serumkonzentration im Vergleich zu jeder Zeit unterhalb des Niveaus der substituierten Patienten.

Pre Substitution = Patienten vor Prolastin®-Infusion (n = 22), Post Substitution = Patienten 2 h nach Prolastin®-Infusion (n = 22), Tag 3 = Tag 3 nach Prolastin®-Infusion (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 12); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Die AAT-Werte der Patienten wurden im Serum nephelometrisch bestimmt. Das AAT im Serum substituierten Patienten wurde direkt vor AAT-Infusion (pre, n = 22), zwei Stunden nach Infusion (post, n = 22) und an Tag 3 (n = 12) nach der Infusion gemessen.

Die AAT-Serumwerte der substituierten Studienteilnehmer stiegen signifikant nach Substitution um das 3,34-fache an [von 0,7907 g/l (SD = 0,2251), auf 2,666 g/l (SD = 0,6420), p < 0,0001]. Am dritten Tag waren die Serumwerte signifikant um das 2,23-fache im Vergleich zu zwei Stunden nach Substitution (post) abgefallen [von 2,281 g/l (SD = 0,6420) auf 1,193 g/l (SD = 0,2403), p < 0,0005]. Nicht-substituierte

Studienteilnehmer ($n = 12$) lagen mit einer mittleren Konzentration von 0,2593 g/l (SD = 0,04623) signifikant niedriger als substituierte Patienten zu allen drei Messzeitpunkten [pre: 0,2593 g/l (SD = 0,04623) vs. 0,7907 g/l (SD = 0,2251), $p < 0,0001$, post: 0,2593 g/l (SD = 0,04623) vs. 2,666 g/l (SD = 0,6420), $p < 0,0001$, Tag 3: 0,2593 g/l (SD = 0,04623) vs. 2,281 g/l (SD = 0,6420), $p < 0,0001$].

Die wöchentliche Substitution von AAT führte zu einem messbaren, 3,34-fachen, signifikantem Serumanstieg von AAT direkt nach Infusion. Im Anschluss fiel der Serumspiegel signifikant um das 2,23-fache an Tag 3 ab. Zu allen drei Messzeitpunkten lagen die AAT-Serumwerte substituierten Patienten oberhalb der angenommen protektiven Grenze von 0,5 g/l.

3.2.1.2 α 1-Antitrypsin-Konzentrationen im Wochenverlauf

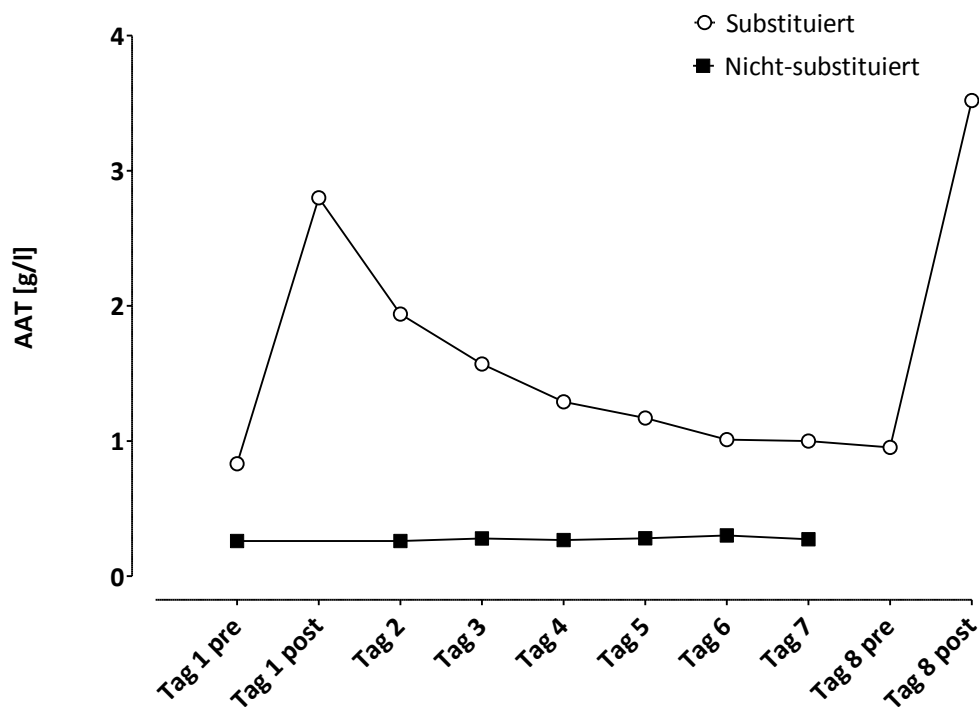


Abbildung 3. α 1-Antitrypsin Konzentrationen von α 1-Antitrypsinmangel-Patienten (PI*ZZ) im Wochenverlauf im Serum

Nephelometrische Bestimmung der AAT-Konzentrationen im Serum jeweils eines Patienten mit Substitution (52 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 31 %, n = 1) und ohne Substitution (61 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 56,9 %, n = 1) im Wochenverlauf.

Substituiert = Patient mit Prolastin®-Infusionstherapie, Nicht-substituiert = Patient ohne Prolastin®-Infusionstherapie, Tag 1 pre = vor Infusion bzw. ohne Substitution, Tag 1 post = 2 h nach Infusion, Tag 2-7 = Tage nach Infusion bzw. Verlauf ohne Substitution, Tag 8 pre = vor Infusion, Tag 8 post = 2 h nach Infusion

Um einen präziseren Verlauf der Infusionstherapie beobachten und die Konzentrationen der AAT Serumwerte von einer Infusion bis zur Nächsten verfolgen zu können, wurde je ein repräsentativer Patient mit, bzw. ohne Substitutionstherapie täglich über den Verlauf einer Woche untersucht.

An Tag 1 war beim Patienten mit Substitutionstherapie ein um 68,63 % höherer AAT-Serumwert messbar als beim Patienten ohne Substitutionstherapie [0,832 g/l vs. 0,261 g/l]. Mit Substitutionstherapie kam es zu einem starken, 3,36-fachen Anstieg auf 2,80 g/l AAT im Serum und einem anschließend konsekutiven Abfall über die folgende Woche hinweg bis auf 1,0 g/l an Tag 7. Die erneute Infusion von AAT führte an Tag 8 zu einem erneuten, 3,69-fachen Anstieg [von 0,953 g/l auf 3,520 g/l]. Die

durchschnittliche Serumkonzentration im Wochenverlauf betrug 1,609 g/l (SD = 0,8969).

Ohne Substitutionstherapie schwankten die Serumwerte im Wochenverlauf zwischen 0,38 % und 15,33 % um den Ausgangswert von Tag 1 [0,260 g/l - 0,301 g/l]. Die durchschnittliche AAT-Konzentration betrug 0,2746 g/l (SD = 0,0142). Signifikante Unterschiede waren aufgrund der geringen Patientenzahl nicht kalkulierbar.

Sowohl in der Patienten-Kohorte (Abbildung 2) als auch im Wochenverlauf mit nur einem AATM-Patienten mit Substitutionstherapie (Abbildung 3) waren Anstiege von AAT im Serum nach Infusion mit Prolastin® zu beobachten, während es ohne Infusion zu keinem Anstieg der Serumwerte kam. Der Wochenverlauf zeigte eine initiale, innerhalb von 24 Stunden starke Reduktion von 30,7 % der AAT-Serumkonzentration von Tag 1 post zu Tag 2 (Abbildung 3). Im restlichen Verlauf der Woche sanken die Serumwerte gleichmäßiger ab. Im Falle des nicht-substituierten Patienten blieben die Serumwerte über die Woche hinweg weitgehend konstant.

3.2.2 Myeloperoxidase und Matrix Metalloproteinase-9 als Biomarker der systemischen Inflammation

3.2.2.1 Myeloperoxidase und Matrix Metalloproteinase-9 vor und nach Substitutionstherapie

MPO und MMP-9 wurden als bekannte Marker der systemischen Inflammation sowie als Indikatoren für die Aktivierung und Degranulation von PMNs im Verlauf der Substitutionstherapie genutzt.

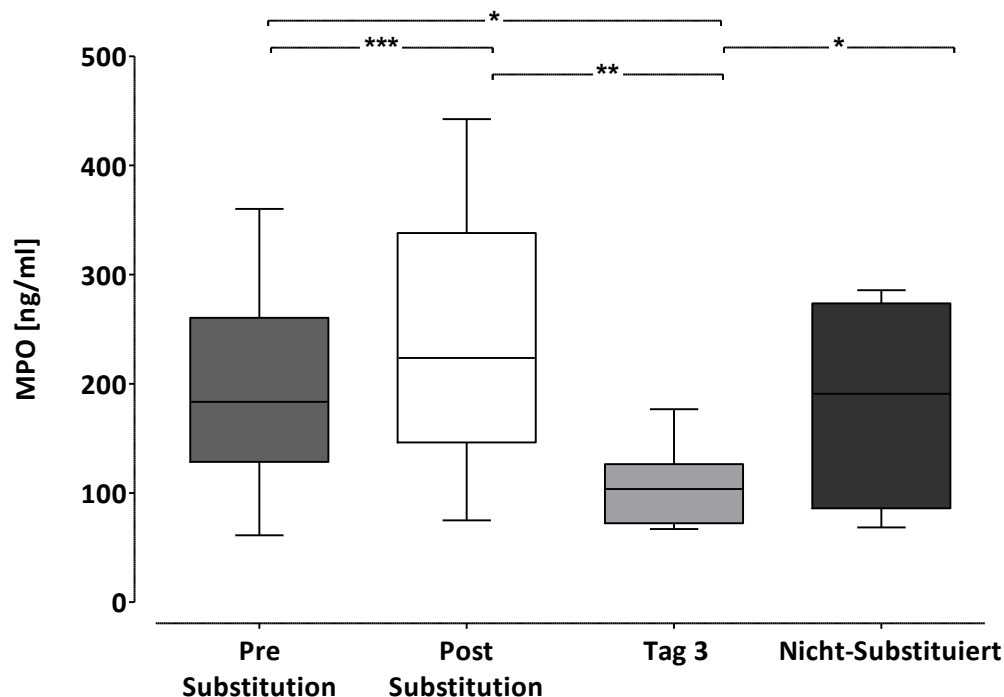


Abbildung 4. Darstellung der mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* im Serum gemessenen Myeloperoxidase-Konzentrationen

Die MPO-Konzentration im Serum stieg nach Infusion von α 1-Antitrypsin signifikant an und lag an Tag 3 signifikant niedriger als vor und nach Substitution. Nicht-substituierte Patienten unterschieden sich im Serumspiegel nicht von Patienten vor Substitution.

Pre Substitution = Patienten vor Prolastin®-Infusion (n = 22), Post Substitution = Patienten 2 h nach Prolastin®-Infusion (n = 22), Tag 3 = Tag 3 nach Prolastin®-Infusion (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 12); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Die Myeloperoxidase (MPO) im Serum stieg zwei Stunden nach der Infusion bei substituierten Patienten (pre/post, n = 22) signifikant um das 1,3-fache [von 187,9 ng/ml (SD = 83,65) auf 244,3 ng/ml (SD = 103,5), p = 0,0002] an. Patienten zeigten am dritten Tag (Tag 3, n = 12) eine signifikante 2,32-fache Reduktion [von 244,3 ng/ml (SD = 103,5) auf 105,3 ng/ml (SD = 35,12), p = 0,0265] gegenüber zwei Stunden nach Infusion. Zusätzlich ließ sich zeigen, dass die MPO-Spiegel substituierten Patienten an Tag 3 sowohl signifikant niedriger gegenüber denen nicht-substituierter Patienten sind [105,3 ng/ml (SD = 35,12) vs. 181,0 ng/ml (SD = 87,09), p = 0,0106], als auch gegenüber Patienten vor Substitutionstherapie [105,3 ng/ml (SD = 35,12) vs. 187,9 ng/ml (SD = 83,65), p = 0,0265]. Zwischen den MPO-Serumwerten von Patienten vor Substitution und nicht-substituierten Patienten gab es keine signifikanten Unterschiede [187,9 ng/ml (SD = 83,65) vs. 181,0 ng/ml (SD = 87,09), p = 0,8214].

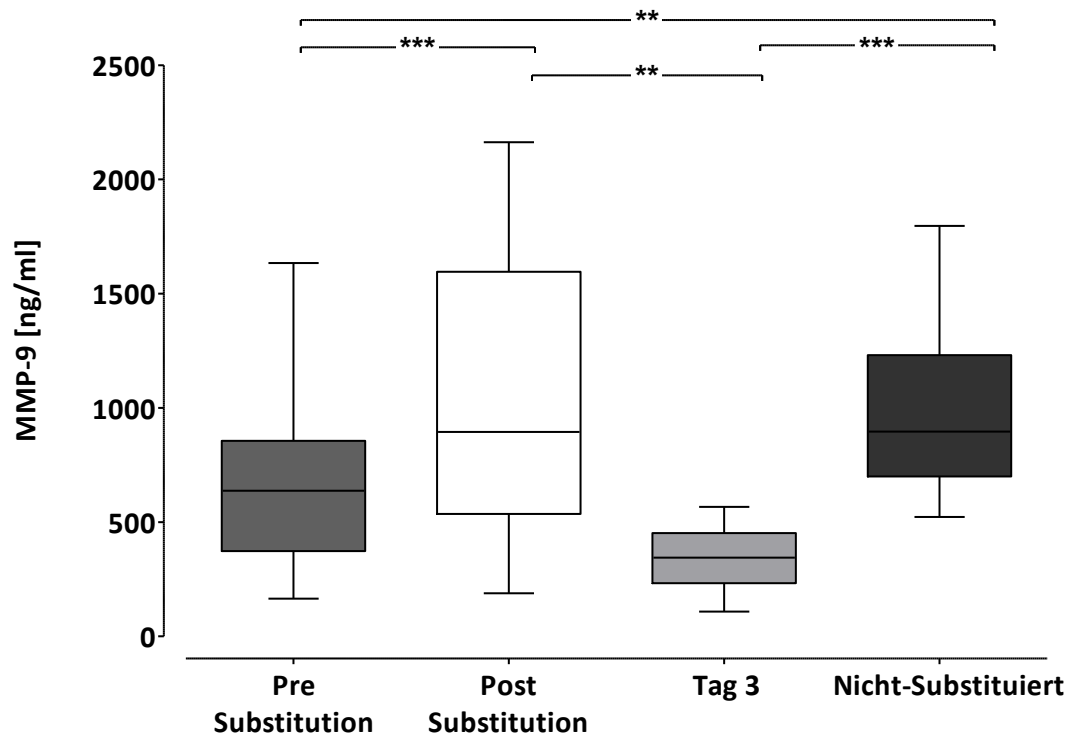


Abbildung 5. Darstellung der im Serum mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* gemessenen Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)-Konzentrationen

Die Werte von MMP-9 stiegen nach Infusion um das 1,56-fache an und waren an Tag 3 um das 3,08-fache abgefallen. Nicht-substituierte Patienten zeigten MMP-9 Werte die sich nicht signifikant von Serumwerten nach Substitution unterschieden.

Pre Substitution = Patienten vor Prolastin®-Infusion (n = 22), Post Substitution = Patienten 2 h nach Prolastin®-Infusion (n = 22), Tag 3 = Tag 3 nach Prolastin®-Infusion (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 12); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Bei AATM-Patienten mit Substitutionstherapie (pre/post, n = 22) stieg die MMP-9-Konzentration nach Substitution signifikant um das 1,56-fache [von 660,1 ng/ml (SD = 349,8) auf 1032 ng/ml (SD = 588), p = 0,0001]. Am dritten Tag fielen die MMP-9 Spiegel um das 3,08-fache ab [von 1032 ng/ml (SD = 588) auf 334,3 ng/ml (SD = 144,2), p = 0,0049]. Substituierte Patienten zeigten sowohl vor der Substitution (pre), als auch am dritten Tag ein signifikant niedrigeres Niveau von MMP-9 im Vergleich zu dem nicht-substituierten Patienten (n = 12) [660,1 ng/ml (SD = 349,8) vs. 987,6 ng/ml (SD = 373,9), p = 0,0183 bzw. 334,3 ng/ml (SD = 144,2) vs. 987,6 ng/ml (SD = 373,9), p < 0,0001]. Verglichen mit dem Ausgangsniveau (pre), waren die MMP-9-Spiegel am dritten Tag nicht signifikant erniedrigt (p = 0,0522).

Nach Infusion (post) von AAT war bei substituierten Patienten ein rascher, innerhalb von zwei Stunden messbarer, signifikanter Anstieg der MMP-9-Werte zu beobachten.

Dieser stieg zu keinem Zeitpunkt über die Werte nicht-substituierter Patienten an. Patienten kurz vor Substitution (pre) hatten signifikant niedrigere MMP-9-Konzentrationen im Serum als nicht-substituierte Patienten. Dieselben Veränderungen der Serumkonzentrationen waren auch für die MPO-Konzentration ersichtlich, welche gleichermaßen nach Substitution mit AAT signifikant anstieg. Die MPO-Konzentration nicht-substituierter Patienten unterschied sich weder zu vor, noch zu den Konzentrationen nach der Substitution. Es waren sowohl die MPO-, als auch die MMP-9-Serumwerte am dritten Tag gegenüber den Serumspiegeln nicht-substituierter Patienten erniedrigt.

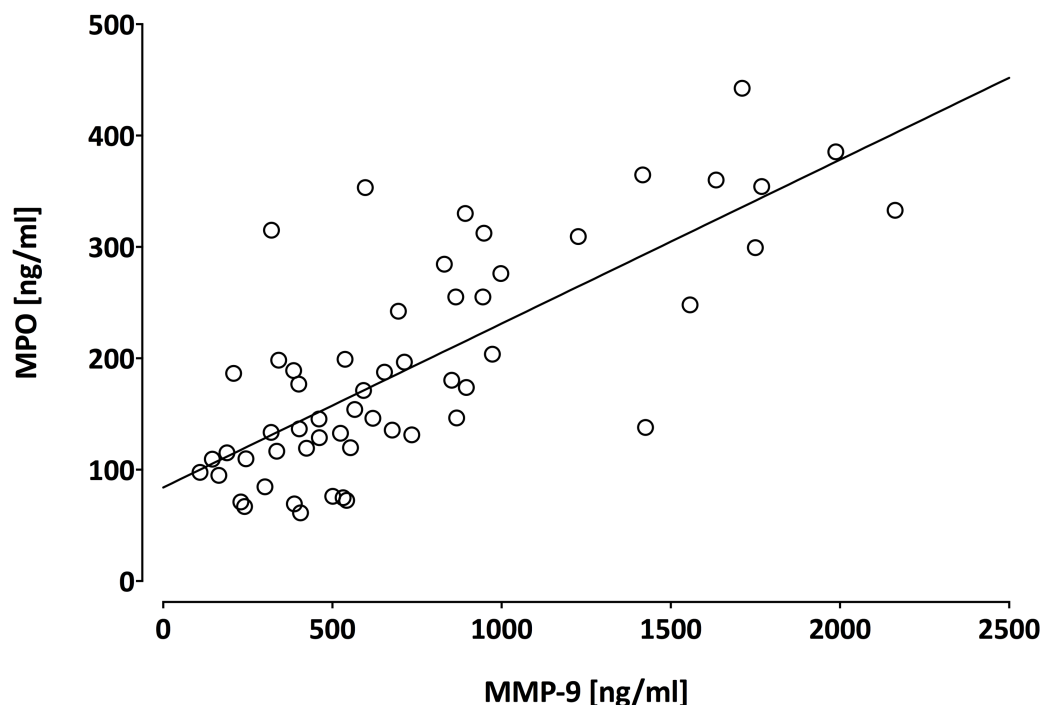


Abbildung 6. Korrelation der steigenden Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Myeloperoxidase (MPO)-Werte von substituierten Patienten

Steigende Serumwerte von MMP-9 und MPO substituierten Patienten zeigten eine signifikant positive Korrelation (Pre & Post Substitution sowie Tag 3, Spearman $r = 0,7284$, $p < 0,0001$, $n = 56$). Die Ausgleichsgerade repräsentiert die lineare Regression der Daten (Steigung $0,1471 \pm 0,01750$, $r^2 = 0,5670$)

Die MPO- und MMP-9-Serumwerte der substituierten AATD Patienten zeigten, alle drei Messzeitpunkte zusammengenommen (pre, post und Tag 3, $n = 56$), eine signifikant positive Korrelation [$p < 0,0001$]: steigende MMP-Werte gingen mit steigenden MPO-Werten einher, bzw. umgekehrt (Abbildung 6). Nicht-substituierte Patienten ($n = 12$) zeigten hingegen keine signifikante Korrelation von MMP-9 und MPO

[$p = 0,3453$] (Daten nicht gezeigt). Auch zwischen AAT-Serumwerten und MPO bzw. MMP-9 war in dieser Patientengruppe keine signifikante Korrelation messbar [$p = 0,9959$ bzw. $p = 0,7313$] (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus zeigten die substituierten Patienten zu allen drei Messzeitpunkten eine signifikante Korrelation zwischen steigenden, bzw. erhöhten AAT-Werten und erhöhten MMP-9- bzw. MPO-Serummarkern [$p = 0,0093$ bzw. $p = 0,0158$] (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2 Myeloperoxidase und Matrix Metalloproteinase-9 im Wochenverlauf

Um die Veränderungen der systemischen Serummarker MMP-9 und MPO, und damit das Aktivitätsniveau, bzw. die Degranulation der PMNs, über die einzelnen Tage hinweg bis zur nächsten Infusion präziser einordnen zu können, wurden exemplarisch die Serumwerte über den Zeitraum einer Woche beobachtet.

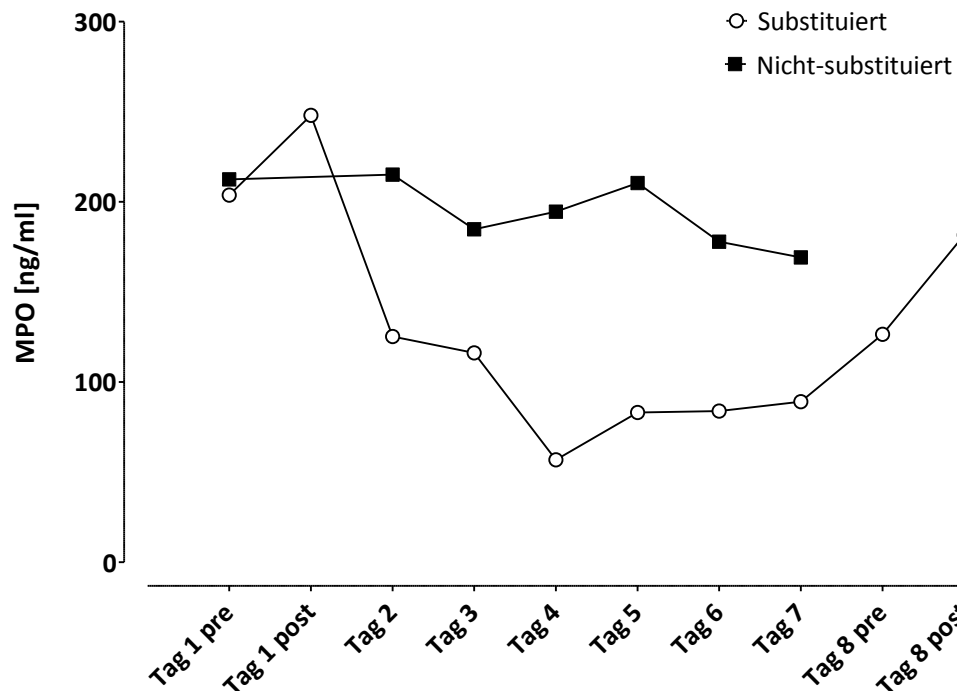


Abbildung 7. Darstellung der Myeloperoxidase (MPO)-Serumkonzentrationen im Wochenverlauf Quantifizierung von MPO im Serum mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* von je einem Patienten mit Substitutionstherapie (52 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 31 %, n = 1) über 8 Tage und einem Patienten ohne Substitutionstherapie (61 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 56,9 %, n = 1) über 7 Tage.

Substituiert = Patient mit Prolastin®-Infusionstherapie, Nicht-substituiert = Patient ohne Prolastin®-Infusionstherapie, Tag 1 pre = vor Infusion bzw. ohne Substitution, Tag 1 post = 2 h nach Infusion, Tag 2-7 = Tage nach Infusion bzw. Verlauf ohne Substitution, Tag 8 pre = vor Infusion, Tag 8 post = 2 h nach Infusion

Der Wochenverlauf des substituierten Patienten (n = 1) zeigte kurz nach Infusion von Prolastin® (zwei Stunden, post) einen Anstieg der MPO-Serumwerte um 21,76 % [von 203,72 ng/ml auf 248,05 ng/ml]. Damit lagen sie über den Serumspiegeln des nicht-substituierten Patienten [n = 1, 169,2 – 215,1 ng/ml]. An Tag 2 fielen sie mit 49,49 % (bzw. um max. 77,08 % an Tag 4) deutlich unter die Spiegel des nicht-substituierten Patienten (Abbildung 8). Vergleichbare MPO-Serumspiegel wurden erst wieder, nach zuvor graduelltem Anstieg über drei Tage, zum Zeitpunkt der erneuten Prolastin®-Infusion an Tag 8 post erreicht [181,595 ng/ml]. Die durchschnittlichen Werte der substituierten Patienten lagen mit 131,4 ng/ml (SD = 61,09) niedriger als bei nicht-substituierten Patienten mit 194,9 ng/ml (SD = 18,3).

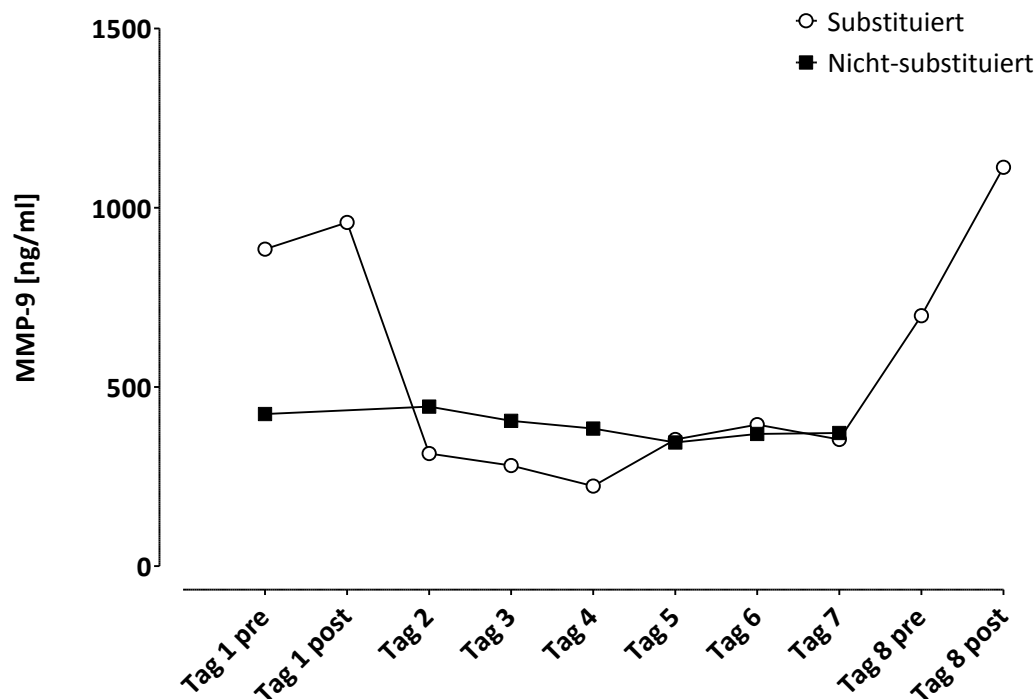


Abbildung 8. Darstellung der Matrix-Metalloproteinase-9-Serumkonzentrationen im Wochenverlauf

Quantifizierung von MMP-9 im Serum mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* von je einem Patienten mit Substitutionstherapie (52 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 31 %, n = 1) über 8 Tage und einem Patienten ohne Substitutionstherapie (61 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 56,9 %, n = 1) über 7 Tage.

Substituiert = Patient mit Prolastin®-Infusionstherapie, Nicht-substituiert = Patient ohne Prolastin®-Infusionstherapie, Tag 1 pre = vor Infusion bzw. ohne Substitution, Tag 1 post = 2 h nach Infusion, Tag 2-7 = Tage nach Infusion bzw. Verlauf ohne Substitution, Tag 8 pre = vor Infusion, Tag 8 post = 2 h nach Infusion

Die MMP-9 Serumkonzentrationen des substituierten Patienten lagen mit 884,27 ng/ml (pre), schon vor Beginn der Prolastin®-Infusion, deutlich über den Werten des nicht-substituierten Patienten [345,01 - 445,32 ng/ml]. Nach Infusion (post) war ein geringer Anstieg von 8,4 % [von 884,27 ng/ml auf 958,57 ng/ml] beobachtbar. Es folgte ein starker Abfall der MMP-9-Serumspiegel von 67,21 % an Tag 2 unter die Spiegel des nicht-substituierten Patienten [von 958,57 ng/ml auf 314,28 ng/ml]. Der nachfolgende graduelle Abfall setzte sich bis einschließlich Tag 4 [223,13 ng/ml] fort. Vergleichbar mit den MPO-Serumwerten, stieg die MMP-9 erst wieder zum Ende der Woche, respektive vor der erneuten Prolastin®-Infusion an Tag 8 pre, sprunghaft um 97,59 % [von 353,55 ng/ml auf 698,565 ng/ml], an. Damit lag sie auch oberhalb der Serumspiegel des nicht-substituierten Patienten. Durchschnittliche MMP-9-Spiegel lagen bei substituierten Patienten mit 557,4 ng/ml (SD = 325,4) höher

als 392 ng/ml (SD = 34,9) bei nicht-substituierten Patienten. Signifikante Unterschiede waren aufgrund der geringen Patientenzahl nicht berechenbar.

Sowohl im Wochenverlauf von MPO, als auch bei MMP-9 waren Anstiege der beiden Biomarker im Serum direkt nach der Prolastin®-Infusion zu beobachten. Nachfolgend kam es an Tag 2 bei beiden Markern des substituierten Patienten zu einem 49,49 %igem bzw. 67,21 %igem Abfall auf Serumspiegel unterhalb denen des nicht-substituierten Patienten. Im Falle der MPO blieben die Serumspiegel bis zur nächsten Substitution an Tag 8 auf einem niedrigeren Niveau. Im Falle der MMP-9 hingegen stiegen die Spiegel ab Tag 4 wieder an. Infolgedessen bestätigten die Wochenverläufe die vor und nach Substitution bzw. an Tag 3 im Serum gemessenen Biomarker (Abbildung 4 und Abbildung 5): auf die kurzzeitige Erhöhung nach Infusion (post) folgte ein rascher Abfall unter die Serumspiegel der nicht-substituierten Patienten. Erneute Anstiege auf vergleichbare Spiegel ließen sich erst gegen Ende der Woche vor der erneuten Substitution verzeichnen.

3.2.3 α 1-Antitrypsin *Western Blot* Analysen

3.2.3.1 α 1-Antitrypsin Fraktionen vor und nach Substitutionstherapie

Um die unterschiedlichen Fraktionen des AAT im Serum nachzuweisen wurden quantitative *Western Blot*-Analysen durchgeführt.

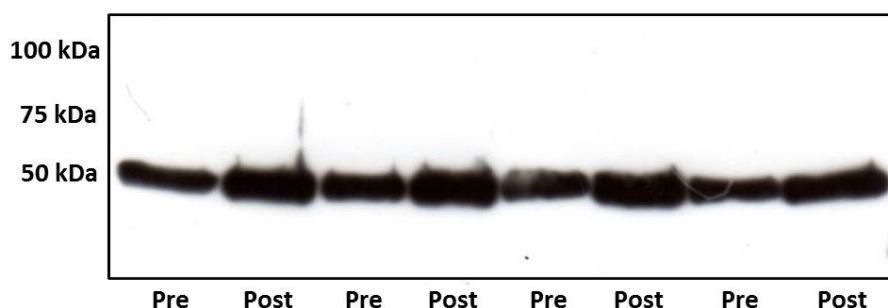


Abbildung 9.1. α 1-Antitrypsin *Western Blot* nach 7,5 % Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese α 1-Antitrypsin *Western Blot* Beispiel aus dem Serum von AATM-Patienten vor (pre) und nach (post) der Infusions- bzw. Substitutionstherapie.

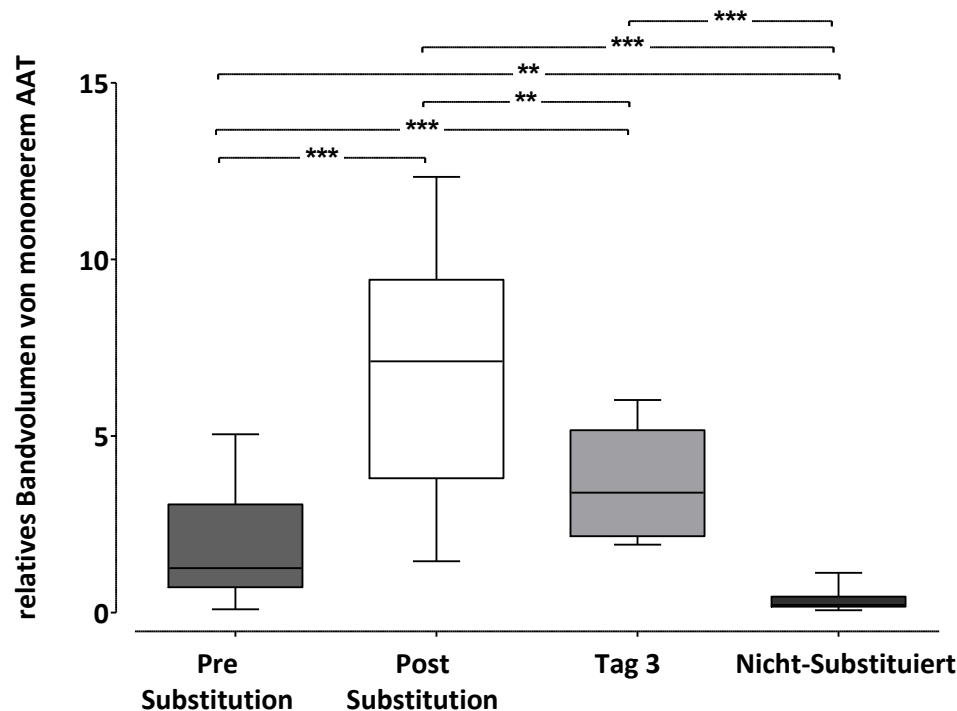


Abbildung 9.2. Quantitative Western Blots von monomerem α 1-Antitrypsin aus dem Serum
Quantifizierung der relativen Bandvolumen nach SDS-PAGE (exemplarische Darstellung eines 7,5 % Gels von substituierten Patienten in Abbildung 9.1.). Anstieg der monomeren AAT-Fraktion nach Infusion und Abfall an Tag 3. Nicht-substituierte Patienten lagen zu jedem Zeitpunkt unter dem Niveau substituierten Patienten.

Pre (Substitution) = Patienten vor Prolastin®-Infusion (n = 22), Post (Substitution) = Patienten 2 h nach Prolastin®-Infusion (n = 22), Tag 3 = Tag 3 nach Prolastin®-Infusion (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 12); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Die monomere Fraktion des AAT zeigte bei substituierten Patienten (pre/post, n = 22) einen starken signifikanten Anstieg des relativen AAT-Bandvolumens im Serum um das 3,75-fache von vor zu nach Substitution [von 1,799 (SD = 1,439) auf 6,751 (SD = 3,116), p < 0,0001]. Am dritten Tag (n = 12) fiel die AAT Serumkonzentration um das 1,83-fache ab [von 6,751 (SD = 3,116) auf 3,698 (SD = 1,481), p = 0,0049]. Der relative Anteil an monomerem AAT nicht-substituierter Patienten (n = 12) lag, mit den nephelometrisch gemessenen AAT-Konzentrationen vergleichbar, um das 5,58 – 20,93-fache im Vergleich zu allen drei Messzeitpunkten der substituierten Patienten signifikant niedriger [pre: 0,3225 (SD = 0,2917) vs. 1,799 (SD = 1,439), p = 0,001, post: 0,3225 (SD = 0,2917) vs. 6,751 (SD = 3,116), p < 0,0001, Tag 3: 0,3225 (SD = 0,2917) vs. 3,698 (SD = 1,481), p < 0,0001].

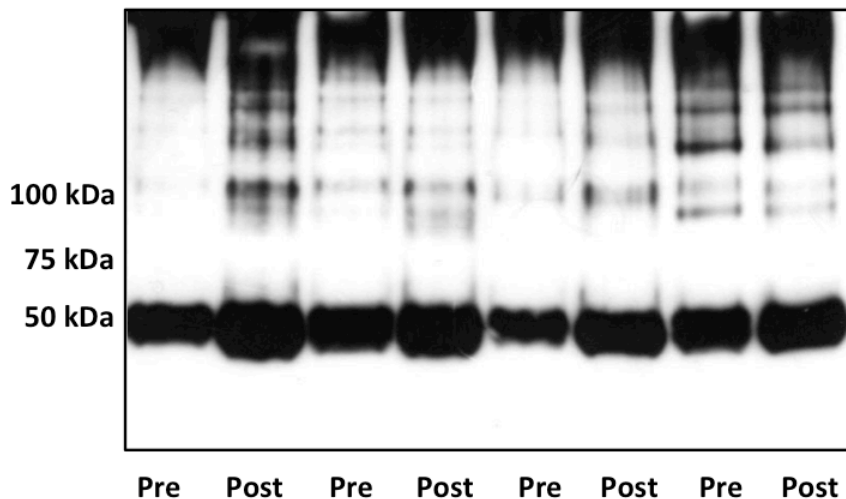


Abbildung 10.1. α 1-Antitrypsin Western Blot nach nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese α 1-Antitrypsin Western Blot Beispiel aus dem Serum von AATM-Patienten vor (pre) und nach (post) der Infusions- bzw. Substitutionstherapie

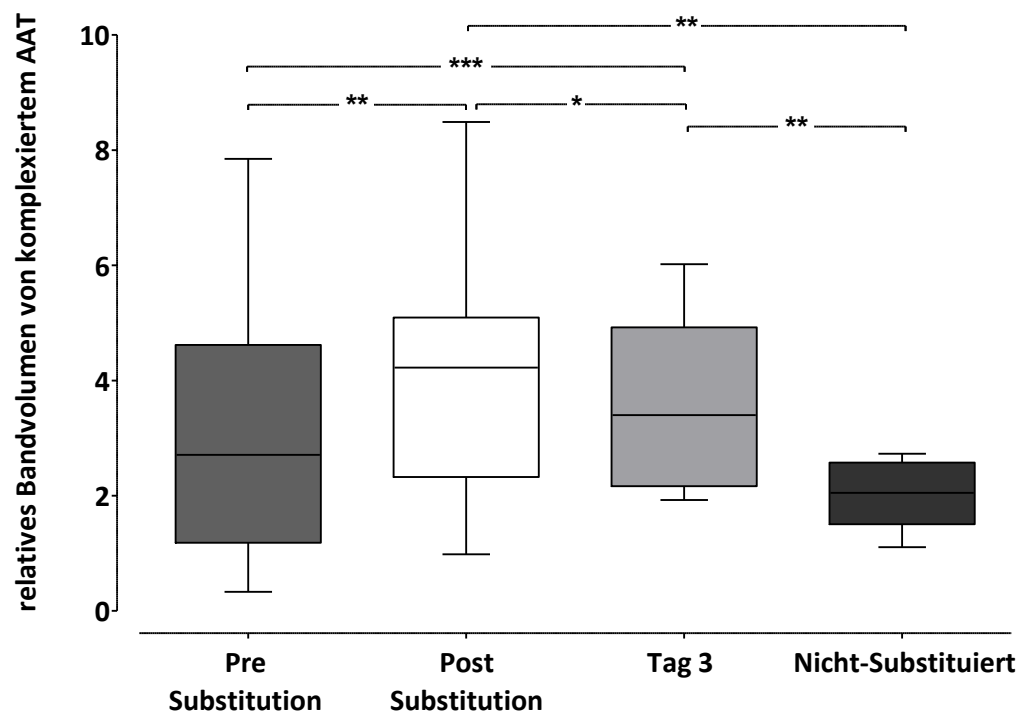


Abbildung 10.2. Quantitative Western Blots von komplexiertem α 1-Antitrypsin Quantifizierung der relativen Bandenvolumen nach Polyacrylamid Gelelektrophorese. Anstieg der komplexierten AAT-Fraktion nach Infusion und relativer Abfall an Tag 3. Nicht-substituierte Patienten lagen zu jedem Zeitpunkt unter dem Niveau von substituierten Patienten.
Pre Substitution = Patienten vor Prolastin® (n = 22), Post Substitution = Patienten 2 h nach Prolastin®-Infusion (n = 22), Tag 3 = Tag 3 nach Prolastin®-Infusion (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 12); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

In den gleichen Serumproben waren mittels Western Blot Analyse von nativen Polyacrylamid Gelen Anstiege der komplexierten AAT-Fraktionen (> 100 kDa,

Abbildung 10) zu registrieren: nach Substitution (post) stieg der Anteil des komplexierten AATs signifikant um das 1,28-fache an [von 3,127 (SD = 2,105) auf 3,995 (SD = 1,844), $p = 0,002$]. Korrespondierend zu den Monomerfraktionen war an Tag 3 ein 1,1-facher Abfall des komplexierten AATs messbar [von 3,995 (SD = 1,844) auf, $p = 0,0231$]. Nicht-substituierte Patienten zeigten, verglichen mit Patienten nach Substitution (post) und Tag 3, einen 1,99, respektive 1,81-fachen signifikant niedrigeren relativen Anteil komplexierten AATs [3,995 (SD = 1,844) vs. 2,007 (SD = 0,5628), $p = 0,001$ bzw. 3,626 (SD = 1,420) vs. 2,007 (SD = 0,5628), $p = 0,0013$]. Die Anteile von vor der Substitution (pre) unterschieden sich hierzu nicht signifikant [$p = 0,0819$].

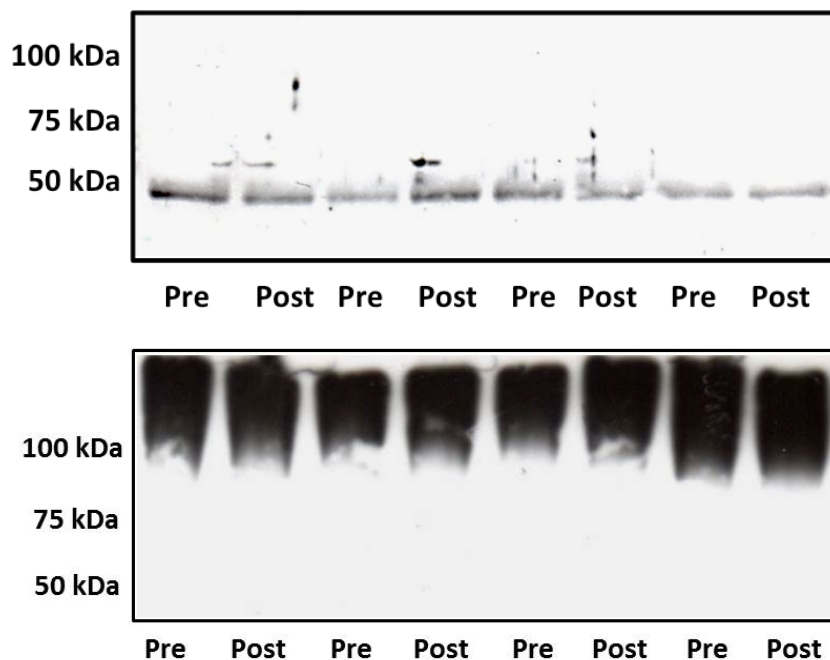


Abbildung 11.1. Oben: Methioninsulfoxid-positiver *Western Blot* nach 7,5 % Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese, Unten: Native Polyacrylamid Gelelektrophorese

Analyse der Patientenserum nach (SDS)-PAGE. Obere Abbildung zeigt methioninsulfoxid-positives Protein bei ca. 52 kDa, welches die Identifikation als α 1-Antitrypsin zulässt.

Untere Abbildung: in der nativen PAGE komplexierte das methioninsulfoxid-positive Protein deutlich oberhalb 100 kDa. Im AAT kam es zur Oxidation von Methionin zu Methioninsulfoxid und damit zur Bildung oxidierten AATs.

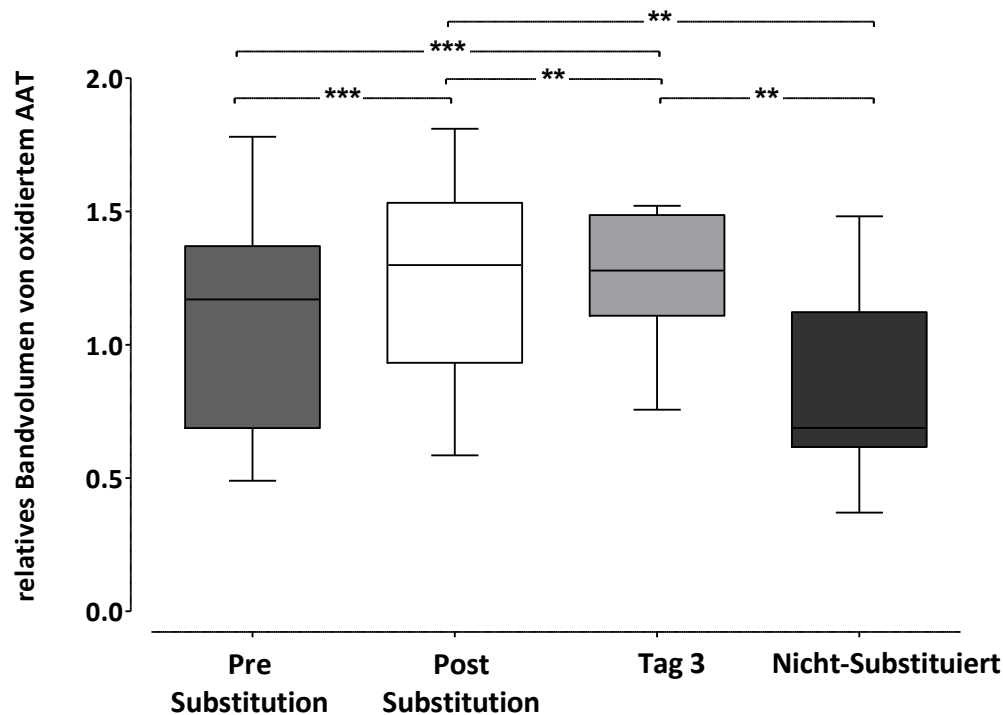


Abbildung 11.2. Quantifizierung der Methioninsulfoxid-positiven *Western Blots*

Es kam zum Anstieg der Anteile des oxAATs nach Infusion, anschließend zum leichten Abfall an Tag 3. Bei nicht-substituierten Patienten lagen die Anteile des oxAATs durchgehend unterhalb derer substituierter Patienten.

Pre Substitution = Patienten vor Prolastin®-Infusion (n = 22), Post Substitution = Patienten 2 h nach Prolastin®-Infusion (n = 22), Tag 3 = Tag 3 nach Prolastin®-Infusion (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 12); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Zur Beobachtung der Auswirkung von erhöhten MPO-Konzentrationen im Serum auf AAT wurde der relative Anteil von oxidiertem AAT in den Patientenseren quantifiziert. Auch hier war bei substituierten Patienten (pre/post, n = 22) ein signifikanter 1,16-facher Anstieg von vor (pre), zu zwei Stunden nach (post) Substitution [von 1,083 (SD = 0,4085) auf 1,255 (SD = 0,3716), p = 0,0001] sowie zu Patienten drei Tage nach Substitution [n = 11, von 1,083 (SD = 0,4085) auf 1,271 (SD = 0,2566), p = 0,0002] zu beobachten. Der oxAAT-Anteil im Serum nicht-substituierter Patienten (n = 12) war am niedrigsten: er unterschied sich um das 1,49- bzw. 1,51-fache signifikant von substituierten Patienten, sowohl zwei Stunden nach Infusion (post), als auch am dritten Tag [0,8400 (SD = 0,3216) vs. 1,255 (SD = 0,3716), p = 0,0052 bzw. 0,8400 (SD = 0,3216) vs. 1,271 (SD = 0,2566), p = 0,0035].

3.2.3.2 α 1-Antitrypsin Fraktionen im Wochenverlauf

Um die Wechsel, bzw. das Gleichgewicht, zwischen den verschiedenen AAT-Fractionen im Serum nach den Prolastin®-Infusionen beobachten zu können, wurde das Serum je eines Patienten der substituierten bzw. nicht-substituierten Gruppe über den Verlauf einer Woche mittels quantitativem *Western Blot* nach nativer PAGE untersucht.

Der substituierte Patient zeigte nach Prolastin®-Infusion einen relativen Anstieg sowohl des monomeren, als auch des komplexierten AATs um das 3,68-fache [von 1,00 auf 3,68 (SD = 0,09)] bzw. 96 % [von 1,00 auf 1,96 (SD = 0,06)]. Während die monomere Fraktion an Tag 2 um 23,19 % [von 3,68 (SD = 0,09) auf 2,83 (SD = 0,09)] abfiel und im restlichen Verlauf der Woche einen stetigen Abfall zwischen 2,45 % und 10,14 % im Vergleich zu Tag 1 post zeigte, stieg die komplexierte AAT-Fraktion noch bis Tag 5 um das 4,38-fache verglichen mit Tag 1 vor der Infusion (pre), weiter an. In den beiden darauffolgenden Tagen sank auch der Anteil von komplexiertem AAT.

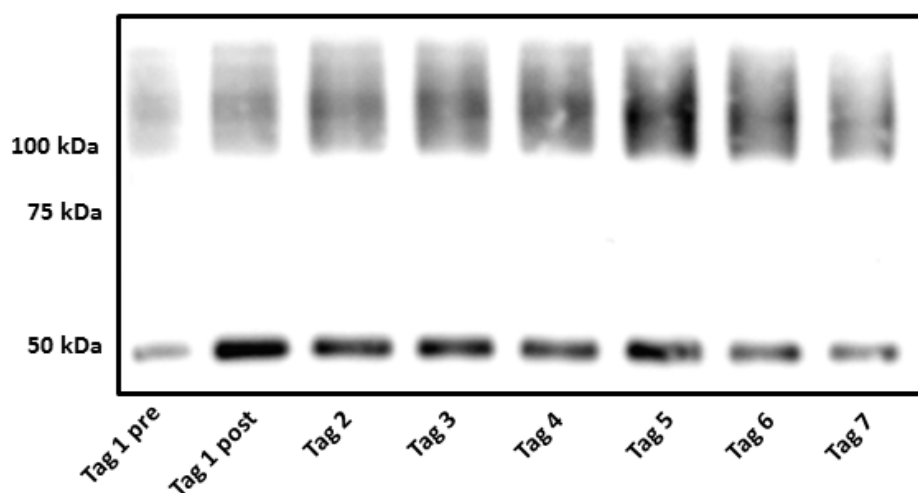


Abbildung 12.1. α 1-Antitrypsin-positiver *Western Blot* nach nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese

Analyse der Patientenserum des substituierten Patienten (52 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 31 %, n = 1) nach nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese und anschließendem AAT-*Western Blot*

Substituiert = Patient mit Prolastin®-Infusionstherapie, monomeres AAT = auf Höhe von ca. 50 kDa im *Western Blot*, komplexiertes AAT = auf Höhe von 100 kDa im *Western Blot*, Tag 1 pre = vor Infusion bzw. ohne Substitution, Tag 1 post = 2 h nach Infusion, Tag 2-7 = Tage nach Infusion

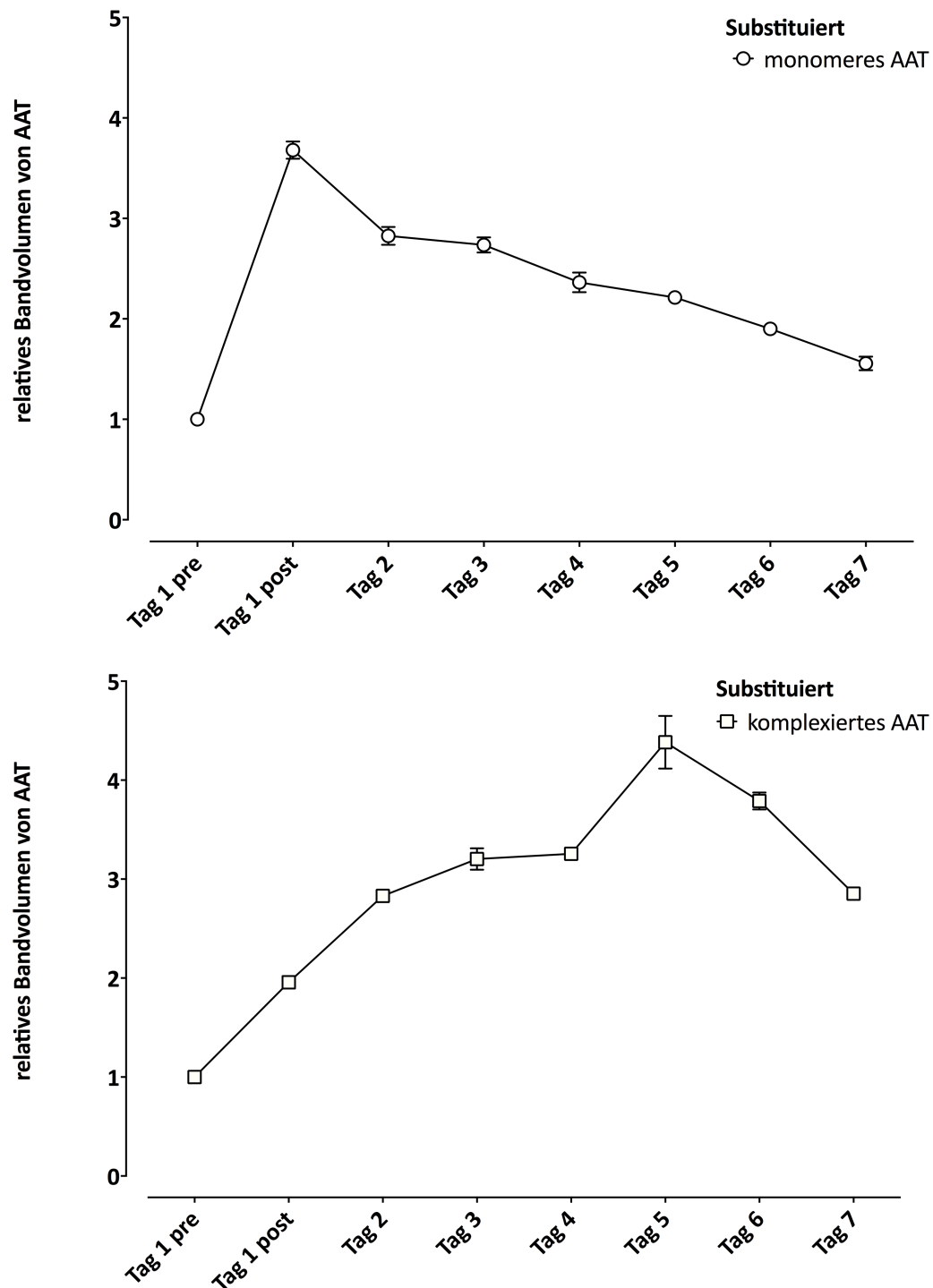


Abbildung 12.2.

Quantifizierung der *Western Blots* mit α 1-Antitrypsin Fraktionen bei einem substituierten Patienten im Wochenverlauf

Analyse und Quantifizierung der Patientenserum des substituierten Patienten (52 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 31 %, n = 1) nach Auftrennung in die unterschiedlichen AAT-Fraktionen. Obere Abbildung: Wochenverlauf der monomeren AAT-Fraktion. Untere Abbildung: Wochenverlauf der komplexierten AAT-Fraktion.

Substituiert = Patient mit Prolastin®-Infusionstherapie, monomeres AAT = auf Höhe von ca. 50 kDa im Western Blot, komplexiertes AAT = auf Höhe von 100 kDa im Western Blot, Tag 1 pre = vor Infusion bzw. ohne Substitution, Tag 1 post = 2 h nach Infusion, Tag 2-7 = Tage nach Infusion

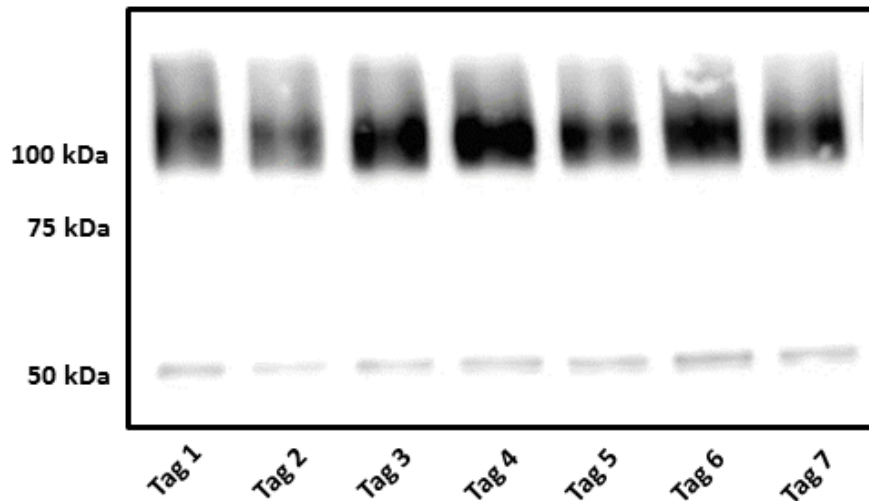


Abbildung 13.1. α 1-Antitrypsin-positiver *Western Blot* nach nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese

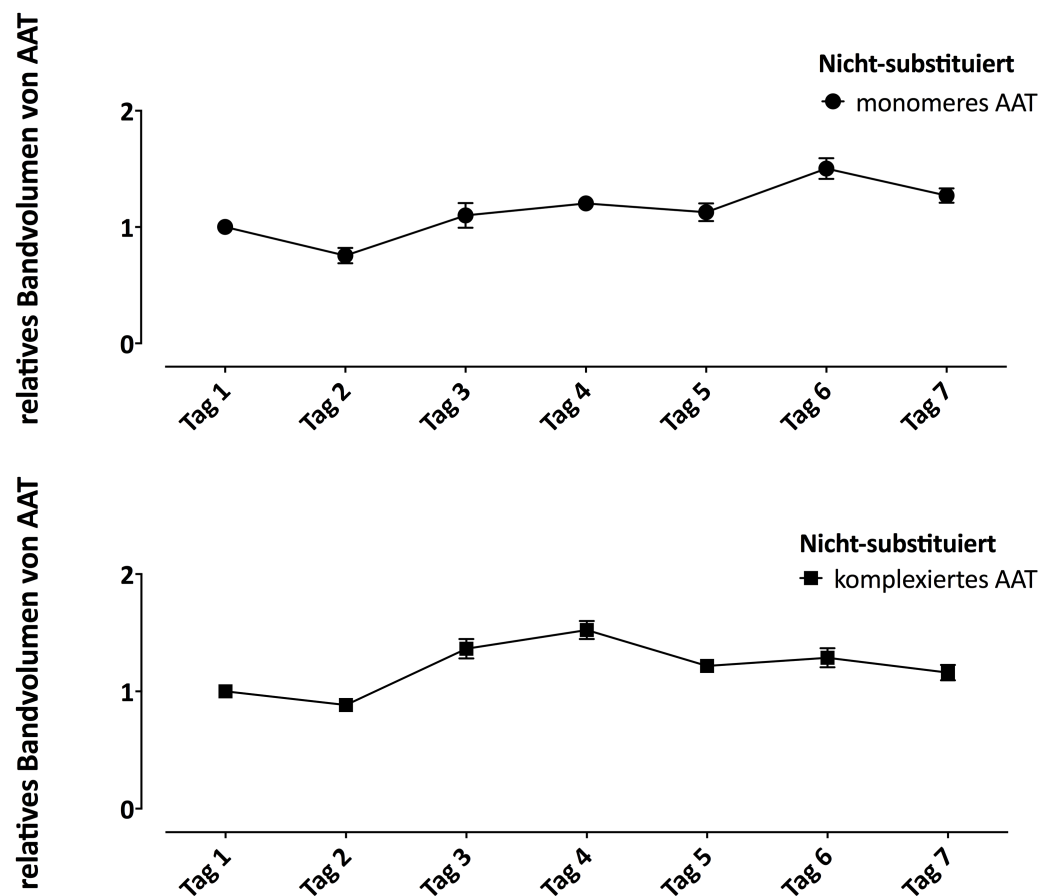


Abbildung 13.2. Quantifizierung der *Western Blots* mit α 1-Antitrypsin Fraktionen bei einem nicht-substituierten Patienten im Wochenverlauf

Analyse der Patientenserum des nicht-substituierten Patienten (61 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 56,9 %, n = 1) nach Auftrennung in die unterschiedlichen AAT-Fraktionen durch Polyacrylamid Gelelektrophorese und anschließendem AAT-*Western Blot* (Abbildung 13.1). Obere Abbildung: Wochenverlauf der monomeren AAT-Fraktion. Untere Abbildung: Wochenverlauf der komplexierten AAT-Fraktion.

Nicht-substituiert = Patient ohne Prolastin®-Infusionstherapie, monomeres AAT = auf Höhe von ca. 50 kDa im *Western Blot*, komplexiertes AAT = auf Höhe von 100 kDa im Western Blot, Tag 1-7 = Verlauf ohne Substitution

Die monomere AAT-Fraktion betrachtet, schwankte der nicht-substituierte Patient zwischen 10 % (Tag 3) und 50,33 % (Tag 6) um den Ausgangswert an Tag 1. Die komplexierte AAT-Fraktion betrachtet, schwankten die Werte zwischen 11,67 % (Tag 2) und 52,33 % (Tag 4) um den Ausgangswert an Tag 1.

Die Anstiege des monomeren AATs, insbesondere beim substituierten Patienten nach Prolastin®-Infusion, zeigten zum Zeitpunkt Tag 1 post einen ähnlichen Verlauf bzw. Anstiege wie die nephelometrisch ermittelten AAT-Serumwerte der Patienten im Wochenverlauf [3,69-fache vs. 3,36-fache, Abbildung 3]. Ähnlich verhielt es sich mit den beiden Fraktionen des nicht-substituierten Patienten: diese schwankten um max. 52,33 %, bzw. 15,33 % im Falle der nephelometrischen Wochenverlaufs-Messungen, um den Ausgangswert (Tag 1). Beim substituierten Patienten ließ sich zusätzlich ein Abfall der monomeren AAT-Fraktion mit einem zeitgleichen Anstieg des komplexierten AATs beobachten (Abbildung 12).

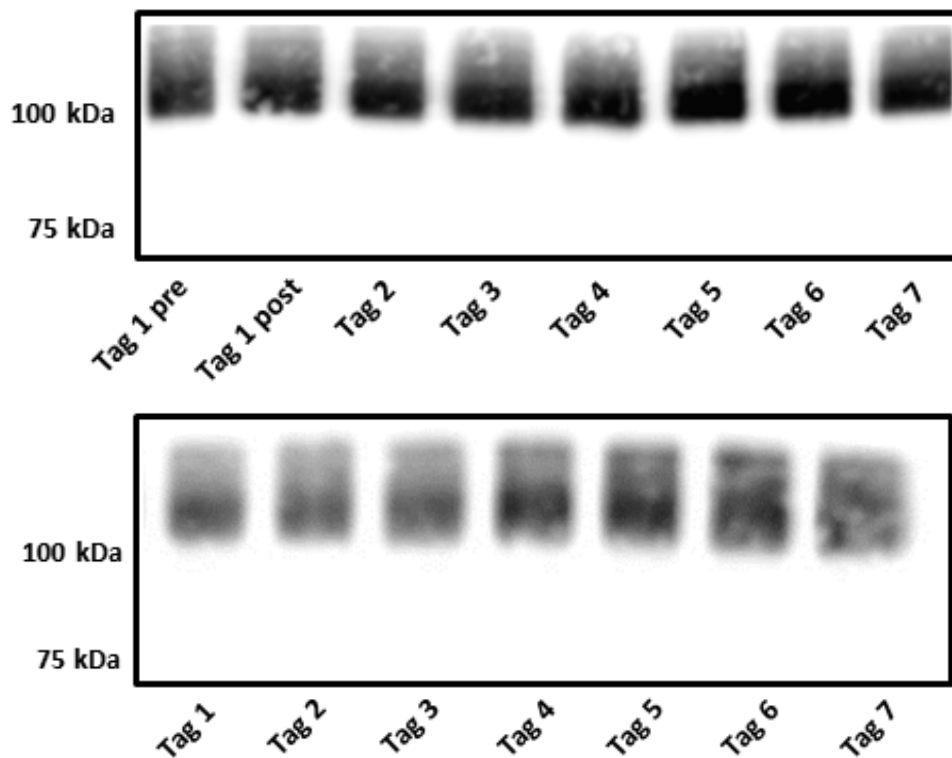


Abbildung 14.1. Methioninsulfoxid-positiver *Western Blot* nach Polyacrylamid Gelelektrophorese. Oben: Substituierter Patient im Wochenverlauf, Unten: Nicht-substituierter Patient im Wochenverlauf.

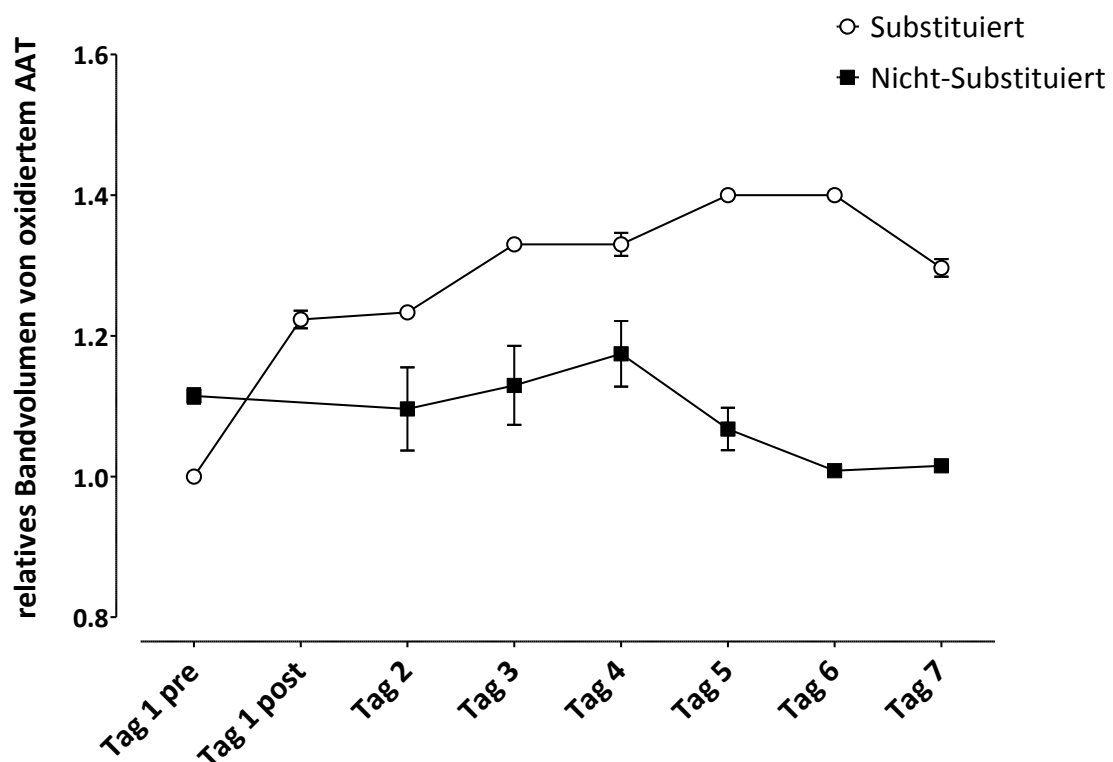


Abbildung 14.2. Quantifizierung der *Western Blots* von Methioninsulfoxid-positivem bzw. oxidiertem α 1-Antitrypsin im Wochenverlauf

Analyse der Patientenserum nach nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese. Der relative Anstieg des oxAAT-Anteils des substituierten Patienten (52 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 31 %, n = 1) steht einem relativen Abfall des nicht-substituierten Patienten (61 Jahre, forciertes expiratorisches Volumen in 1 sec = 56,9 %, n = 1) gegenüber.

Substituiert = Patient mit Prolastin®-Infusionstherapie, Nicht-substituiert = Patient ohne Prolastin®-Infusionstherapie, Tag 1 pre = vor Infusion bzw. ohne Substitution, Tag 1 post = 2 h nach Infusion, Tag 2-7 = Tage nach Infusion bzw. Verlauf ohne Substitution

Im Wochenverlauf des substituierten Patienten war zunächst ein sprunghafter Anstieg des Methioninsulfoxid-positiven, bzw. oxidierten, AATs um 22,33 % [von 1,0 auf 1,22 (SD = 0,0125)] an Tag 1 post zu verzeichnen. Die Höchstwerte wurden nach einem maximalen Anstieg von 40 %, im Vergleich zu Tag 1 pre, an Tag 5 und 6 erreicht [von 1,0 auf 1,40 (SD = 0,0082)]. Der nicht-substituierte Patient präsentierte zu Wochenbeginn einen größeren Anteil Methioninsulfoxid-positiven AATs [1,00 vs. 1,1147 (SD = 0,0109)]. Über die gesamte Woche betrachtet, schwankten die Werte nur zwischen 1,33 % (Tag 3) und 9,54 % (Tag 6) um den Ausgangswert an Tag 1 pre. Im direkten Vergleich lagen die Anteile oxidierten AATs des substituierten Patienten ab Tag 1 post über denen des nicht-substituierten Patienten.

Über die gesamte Woche betrachtet stiegen beim substituierten Patienten sowohl die Werte des monomeren, komplexierten, als auch des oxidierten AATs nach Substitution an. Die AAT Oxidation von Methioninresten erreichte an Tag 5 ihr Maximum. Der monomere Anteil des AATs fiel nach Substitution, vergleichbar mit den nephelometrisch gemessenen Serumwerten (Abbildung 3) im Wochenverlauf, kontinuierlich ab. Beim nicht-substituierten Patienten waren keine vergleichbaren Schwankungen von monomerem, komplexiertem und oxidiertem AAT im Serum zu beobachten.

3.3 Oxidation von α 1-Antitrypsin

3.3.1 Verlust der hemmenden Funktion von α 1-Antitrypsin nach Oxidation

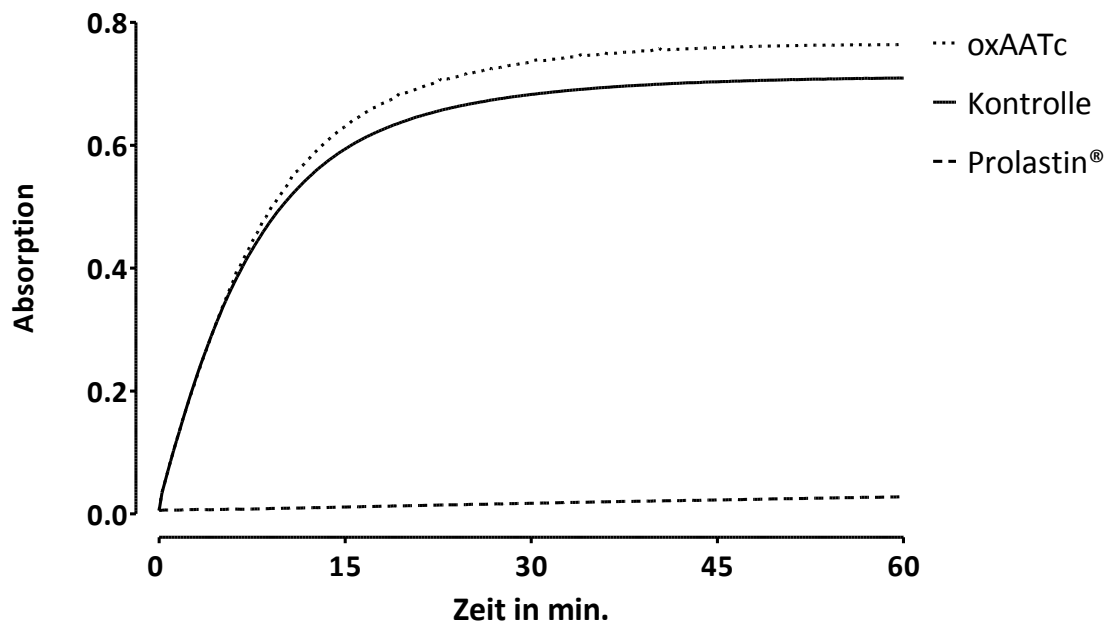


Abbildung 15. Substratumsatz der humanen neutrophilen Elastase nach Inkubation mit Prolastin® (α 1-Antitrypsin) und chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin

Umsatz von N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide-Substrat durch humane neutrophile Elastase nach Inkubation mit PBS, Prolastin® und oxAATc. Die Absorption war, nach durch die neutrophile Elastase umgesetztem Substrat, erhöht. Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten. Nonlineare Regression der Daten (Zeitpunkte bis 335,53 sec): Kontrolle (Steigung = 0,001022, $r^2 = 0,9932$), Prolastin® (Steigung = $4,497 \cdot 10^{-7}$, $r^2 = 0,7417$), oxAATc (Steigung = 0,001027, $r^2 = 0,9948$)

oxAATc = oxidiertes α 1-Antitrypsin, Kontrolle = PBS-Lösung, Prolastin® = unbehandeltes AAT.

Um die Auswirkungen von oxAAT auf PMNs *ex vivo* beobachten zu können war, die Herstellung von chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin (oxAATc) und die anschließende Verifizierung des Oxidationsprozesses mittels eines enzymatischen Tests notwendig. Die Testung beruht auf der inhibitorischen Fähigkeit von AAT gegenüber Elastasen. OxAAT hingegen ist, aufgrund der Oxidation der Methioninreste im funktionellen Zentrum, nicht zur optimalen Inhibierung des Enzyms befähigt.

Nach Zugabe von Substrat zeigte sich im Falle von oxAATc und der Kontrolllösung eine zunehmende Absorption, und damit ein Substratumsatz. Der Umsatz erreichte nach 60 min sein Maximum bei einer Absorption von 0,764 bzw. 0,709. Nach Inkubation mit Prolastin® und anschließendem Substratzusatz kam es zu keinem vergleichbaren, bzw. nur sehr geringem Substratumsatz [Absorption 0,028 nach 60 min]. Im linearen

Bereich der Enzymkinetik (bis 335,53 sec) kam es zu statistisch signifikanten Unterschieden der Steigungen: der Substratumsatz der neutrophilen Elastase unterschied sich nach Inkubation mit Prolastin® sowohl signifikant von der Kontrolllösung, als auch von oxAATc [$4,497 \cdot 10^7$ vs. 0,001022, $p < 0,0001$ bzw. vs. 0,001027, $p < 0,0001$]. Zwischen dem Substratumsatz der Kontrolllösungs- bzw. oxAATc-Inkubation kam es zu keinem signifikantem Unterschied [0,001022 vs. 0,001027, $p = 0,8194$].

3.3.2 α 1-Antitrypsin-Elastase-Komplexformierung nach Oxidation

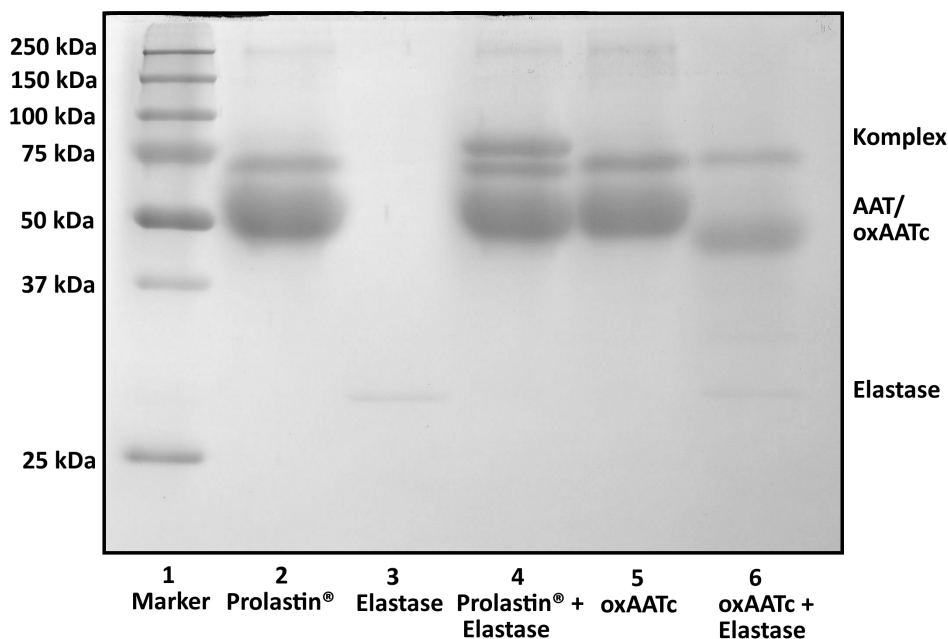


Abbildung 16. Nachweis der Komplexbildung von Prolastin® (α 1-Antitrypsin) und chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin mit porciner Pankreaselastase

12,5 % Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese. 10 μ g Prolastin® bzw. oxAATc wurden nach 30 min Inkubation pro Spur mit und ohne Elastase beladen. AAT bildete, anders als oxAATc, bei 75 kDa einen SDS-stabilen Komplex mit der Elastase (Spur 4).

Marker = molekularer Gewichtsmarker, Prolastin® = unbehandeltes AAT, Elastase = porcine Pankreaselastase, Komplex = SDS-stabile Verbindung von AAT und der Elastase.

Zur zusätzlichen Bestätigung des erfolgreichen Oxidationsprozesses wurde die Aufhebung der Fähigkeit von oxAATc zur Komplexbildung mit porciner Elastase nachgewiesen. AAT und die porcine Elastase bildeten nach 30 min Inkubation einen SDS-stabilen Komplex bei 75 kDa (Spur 4). Diese Komplexbildung war nach Oxidation des AATs nicht mehr möglich bzw. sichtbar (Spur 6). Sowohl AAT (Spur 2 und 4) als auch oxAATc (Spur 5 und 6) liefen im SDS-Gel auf einer Höhe von 52 kDa. Die

aufgetragene porcine Elastase blieb in Spur 3 und 6 als dünne Bande zwischen 25 und 37 kDa sichtbar.

Sowohl der enzymatische Test, als auch die fehlende Komplexbildung in der SDS-PAGE bestätigten einen Verlust der inhibierenden Enzymfunktion sowie der Fähigkeit zur Komplexbildung mit porciner Elastase nach chemischer Oxidation.

3.4 Ex vivo Stimulation von polymorph-nukleären Granulozyten

3.4.1 Auswirkungen von chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin auf die Freisetzung von Myeloperoxidase, Matrix Metalloproteinase-9 und Interleukin-8

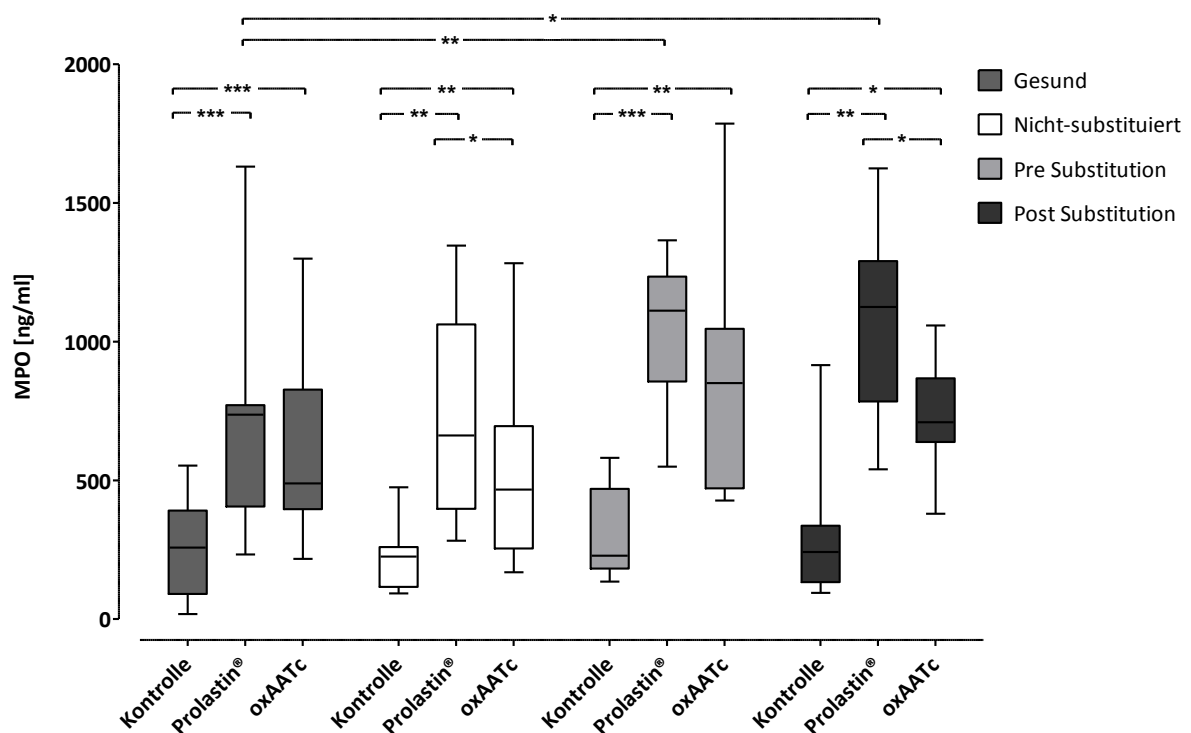


Abbildung 17. Degranulation von Myeloperoxidase durch polymorph-nukleäre Granulozyten nach Stimulation

Messungen mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* aus dem Zellmedium nach 4 h Inkubation (37°C, 5 % CO₂). Stimuliert wurde mit je 1 mg/ml Prolastin® oder chemisch oxidiertem AAT.

Kontrolle = RPMI-Zellmedium, Prolastin® = unbehandeltes AAT, oxAATc = chemisch oxidiertes Prolastin®, Gesund = gesunde Kontrollgruppe (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 8), Pre Substitution = Patienten vor Prolastin®-Infusion (n = 8), Post Substitution = Patienten nach Prolastin®-Infusion (n = 8); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Die Messung des degranulierten MPOs erfolgte aus dem PMN-Zellkulturüberstand. Die PMNs waren zuvor aus Probandenblut isoliert und vier Stunden mit dem

entsprechenden AAT inkubiert worden. Die Stimulation mit Prolastin® führte bei allen vier Vergleichsgruppen zur signifikant erhöhten MPO-Degranulation: bei der gesunden Kontrollgruppe (n = 12) stiegen die Werte signifikant um das 2,72-fache [von 245,3 ng/ml (SD = 168,9) auf 668,1 ng/ml (SD = 370,9), p = 0,0005]. In der nicht-substituierten Patientengruppe (n = 8) stieg die MPO Konzentration um das 3,24-fache an [von 223,7 ng/ml (SD = 121,4) auf 724,8 ng/ml (SD = 368,4), p = 0,0011]. Bei den substituierten Patienten (pre/post, n = 8) um das 3,52-fache vor Infusion (pre) [von 296,9 ng/ml (SD = 166,6) auf 1045 ng/ml (SD = 260,7), p < 0,0001], bzw. um das 3,54-fache nach Infusion (post) [von 307 ng/ml (SD = 260,7) auf 1089 ng/ml (SD = 344), p = 0,0078]. Die Inkubation mit oxidiertem AAT führte in der gesunden Kontrollgruppe zu Anstiegen um das 2,46-fache [von 245,3 ng/ml (SD = 168,9) auf 602,8 ng/ml (SD = 330,6), p = 0,0002], in der nicht-substituierten Patientengruppe um das 2,35-fache [von 223,7 ng/ml (SD = 121,4) auf 526,6 ng/ml (SD = 356,4), p = 0,0078]. Patienten vor Substitution (pre) stiegen nach oxAATc-Behandlung hingegen um 2,92-fache [von 296,9 ng/ml (SD = 166,6) auf 867 ng/ml (SD = 449,2), p = 0,0024], bzw. um 2,38-fache nach Substitution (post) [von 307 ng/ml (SD = 260,7) auf 731,6 ng/ml (SD = 198,8), p = 0,0156]. Zusätzlich war in der Gruppe der nicht-substituierten Patienten die Ausschüttung bei oxAATc-Stimulation um 27,35 % signifikant niedriger gegenüber Prolastin®. In der substituierten Patientengruppe war die MPO-Ausschüttung nach oxAATc-Stimulation nach Infusion (post) um 32,82 % niedriger als unter Prolastin® [526,6 ng/ml (SD = 356,4) vs. 724,8 ng/ml (SD = 368,4), p = 0,0234 bzw. 731,6 ng/ml (SD = 198,8) vs. 1089 (SD = 344) ng/ml, p = 0,0255]. Probandengruppen-übergreifend waren die MPO-Spiegel der gesunden Kontrollgruppe nach Stimulation mit Prolastin® um 36,07 %, bzw. 38,65 % niedriger als die Patienten vor, respektive nach Substitution [668,1 ng/ml (SD = 370,9) vs. 1045 ng/ml (SD = 260,7), p = 0,0098 bzw. 668,1 ng/ml (SD = 370,9) vs. 1089 ng/ml (SD = 344), p = 0,0339].

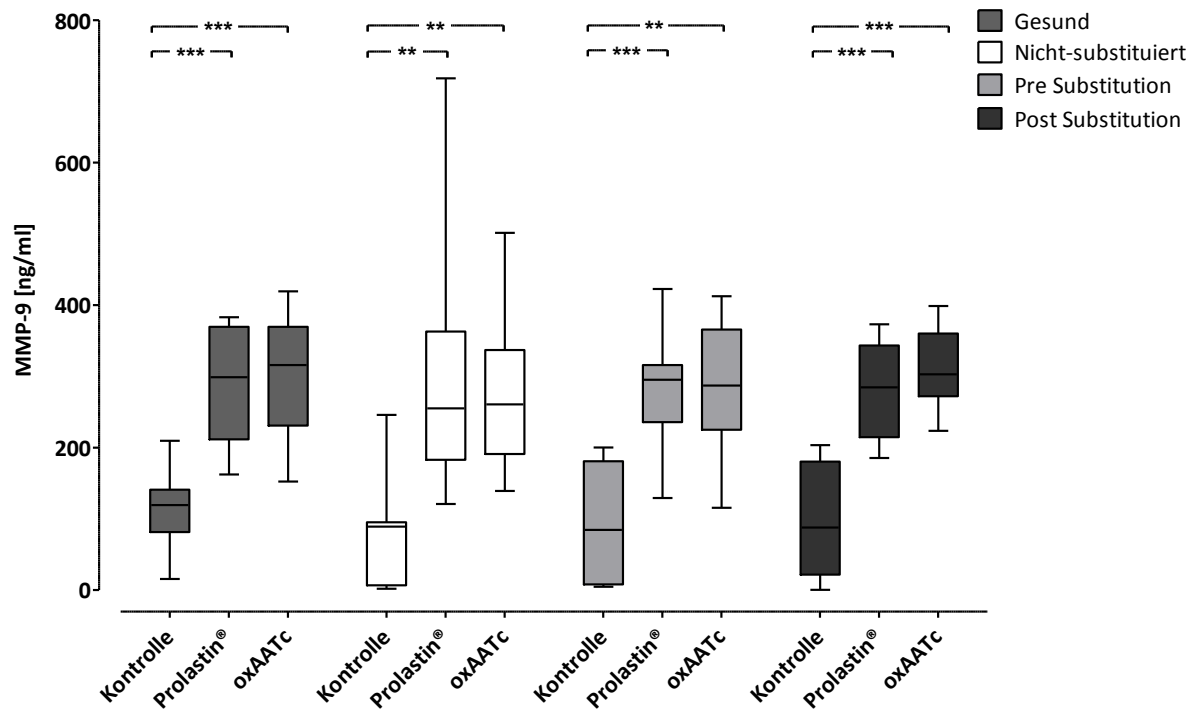


Abbildung 18. Degranulation von Matrix-Metalloproteinase-9 durch polymorph-nukleäre Granulozyten nach Stimulation

Messungen mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* aus dem Zellmedium nach 4 h Inkubation (37°C, 5 % CO₂). Stimuliert wurde mit je 1 mg/ml Prolastin® oder chemisch oxidiertem AAT.

Kontrolle = RPMI-Zellmedium, Prolastin® = unbehandeltes AAT, oxAATc = chemisch oxidiertes Prolastin®, Gesund = gesunde Kontrollgruppe (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 8), Pre Substitution = Patienten vor Prolastin®-Infusion (n = 8), Post Substitution = Patienten nach Prolastin®-Infusion (n = 8); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Die Stimulationsexperimente mit Prolastin® bzw. oxidiertem AAT führten in allen vier Vergleichsgruppen zu signifikanten Anstiegen der MMP-9 Werte im Zellkulturüberstand. In der gesunden Kontrollgruppe (n = 12) kam es sowohl im Falle von Prolastin® zu einem 2,58-fachen, als auch im Falle von oxAATc zu einem 2,66-fachen, signifikanten Anstieg [von 113,5 ng/ml (SD = 53,14) auf 293,5 ng/ml (SD = 79,32), p = 0,0005 bzw. auf 302,8 ng/ml (SD = 82,09), p = 0,0005]. Bei nicht-substituierten Patienten (n = 8) stiegen die Werte unter Prolastin®-Behandlung signifikant um das 3,84-fache an, bei Behandlung mit oxAATc um das 3,53-fache [von 79,64 ng/ml (SD = 79,07) auf 305,9 ng/ml (SD = 185,9), p = 0,0078 bzw. auf 281,4 ng/ml (SD = 112,4), p = 0,0078]. Substituierte Patienten (pre/post, n = 8) vor Infusion zeigten unter Prolastin®-Behandlung signifikante Anstiege um das 3,08-fache, bzw. um das

3,12-fache unter oxAATc-Behandlung [von 91 ng/ml (SD = 81,87) auf 280,6 ng/ml, $p = 0,0001$, bzw. auf 285,5 ng/ml (SD = 93,96), $p = 0,0012$].

Nach Infusion (post) stiegen die MMP-9-Werte unter Prolastin®-Behandlung um das 3,01- bzw. 3,3-fache unter oxAATc-Behandlung an [von 94 ng/ml (SD = 77,66) auf 283,1 ng/ml (SD = 67,26), $p = 0,0002$, bzw. auf 310,2 ng/ml (SD = 56,18), $p < 0,0001$]. Probandengruppen-übergreifend waren keine signifikanten Unterschiede beobachtbar (Abbildung 18).

Die Degranulation von MPO und MMP-9 führte durch Aktivierung der PMNs in allen vier Untersuchungsgruppen zu einem signifikanten Anstieg nach Stimulierung mit Prolastin® und oxAATc. Nur bei Patienten der nicht-substituierten und substituierten Gruppe (post) kam es bei der MPO-Degranulation zu einem signifikanten Unterschied zwischen oxAATc und Prolastin®-Stimulation. Gruppenübergreifend betrachtet lag die Freisetzung von MPO durch PMNs unter Prolastin®-Stimulierung bei Patienten vor und nach Substitution (pre/post) signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 17).

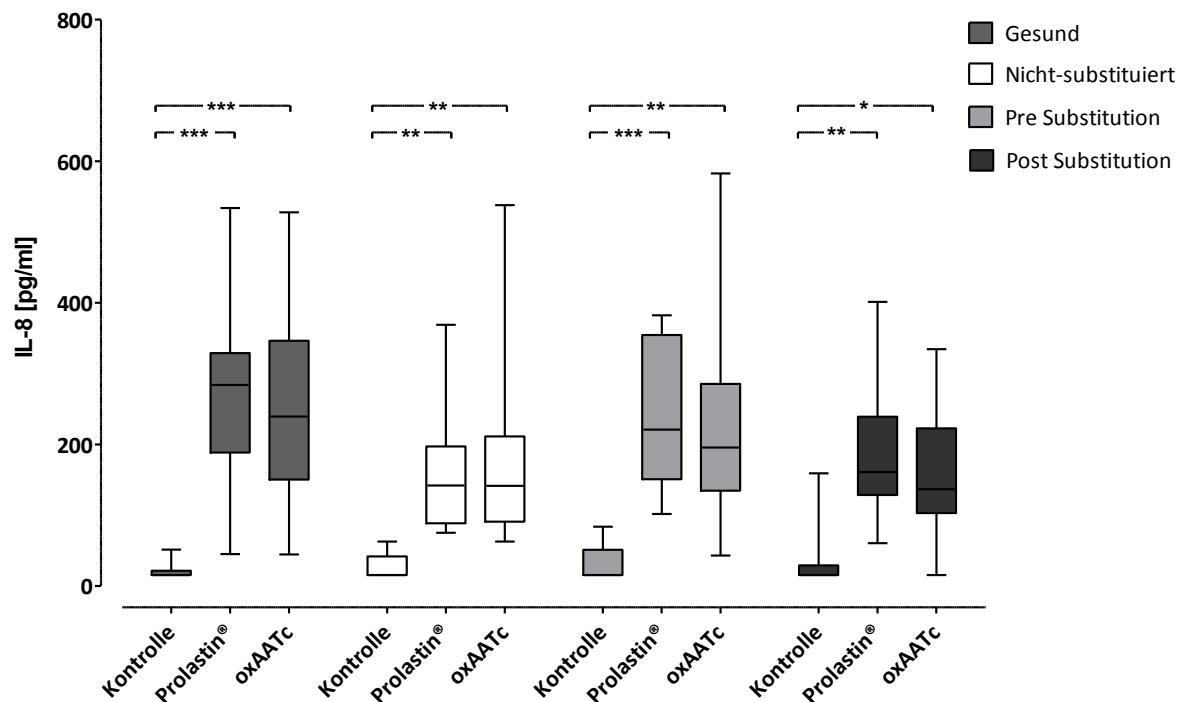


Abbildung 19. Sekretion von Interleukin-8 durch polymorph-nukleäre Granulozyten nach Stimulation

Messungen mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* aus dem Zellmedium nach 4 h Inkubation (37°C, 5 % CO₂). Stimuliert wurde mit je 1 mg/ml Prolastin® oder chemisch oxidiertem AAT.

Kontrolle = RPMI-Zellmedium, Prolastin® = unbehandeltes AAT, oxAATc = chemisch oxidiertes Prolastin®, Gesund = gesunde Kontrollgruppe (n = 12), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 8), Pre Substitution = Patienten vor AAT-Infusion (n = 8), Post Substitution = Patienten nach AAT-Infusion (n = 8); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Als dritter biologischer Entzündungsmarker wurde die Sekretion von IL-8 mittels ELISA quantifiziert. Hier zeigten sich, wie bei beiden vorangehenden Biomarkern, signifikante Unterschiede in Reaktion auf die Behandlung mit Prolastin® sowie oxAATc. In der gesunden Kontrollgruppe (n = 12) stieg der IL-8-Wert signifikant nach Prolastin®-Stimulation um das 12,62-fache [von 21,61 pg/ml (SD = 12,48) auf 272,8 pg/ml (SD = 134,1), p = 0,0005] bzw. um das 11,86-fache nach oxAATc-Stimulation an [von 21,61 pg/ml (SD = 12,48) auf 256,3 pg/ml (SD = 136,6), p = 0,0005]. Die IL-8-Werte nicht-substituierter Patienten stiegen nach Stimulation mit Prolastin® um das 6,27-fache bzw. um das 6,9-fache nach oxAATc-Behandlung an [von 25,88 pg/ml (SD = 19,31) auf 162,4 pg/ml (SD = 94,49), p = 0,0078 bzw. auf 178,8 pg/ml (SD = 151,2), p = 0,0078]. Substituierte Patienten (pre/post, n = 8) vor Infusion reagierten nach Stimulation mit Prolastin® mit einem signifikanten, 7,34-fachen

Anstieg [von 32,9 pg/ml (SD = 25,97) auf 241,6 pg/ml (SD = 109,9), $p = 0,0078$]. Unter oxAATc-Behandlung stiegen die IL-8-Werte um das 6,92-fache [von 32,9 pg/ml (SD = 25,97) auf 227,8 pg/ml (SD = 162,4), $p = 0,0078$]. Nach Infusion (post) waren unter Prolastin®-Stimulation hingegen geringere Anstiege um das 2,75- bzw. 4,33-fache unter oxAATc-Stimulation zu beobachten [von 35,82 pg/ml (SD = 50,30) auf 98,64 pg/ml (SD = 271,9), $p = 0,0078$ bzw. auf 155,3 pg/ml (SD = 97,92), $p = 0,0156$].

Die Stimulation von PMNs *ex vivo* führte, sowohl mit Prolastin® als auch mit oxAATc, in allen vier Gruppen zu signifikanten Anstiegen der IL-8-Degranulation. Zwischen der Behandlung mit oxAATc und Prolastin® gab es, innerhalb der jeweiligen Gruppe und gruppenübergreifend, keine signifikanten Unterschiede.

3.4.2 Auswirkungen von chemisch oxidiertem α 1-Antitrypsin auf Neutrophile Adhäsion

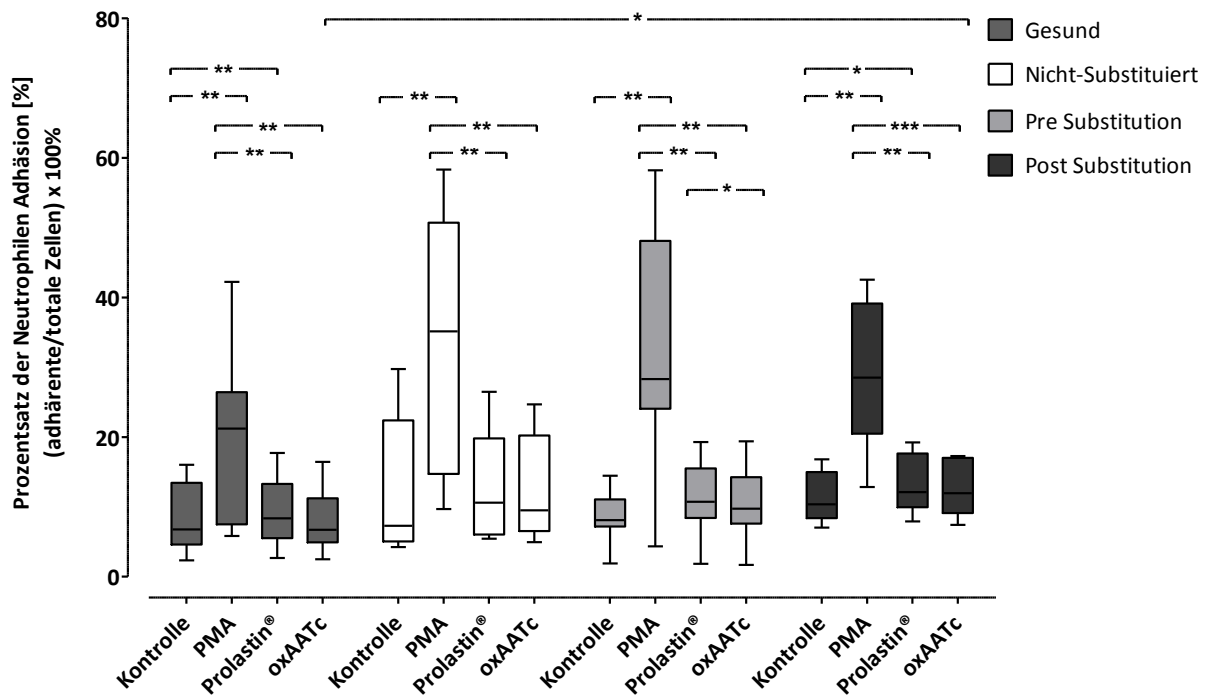


Abbildung 20. Neutrophile Adhäsion der polymorph-nukleären Granulozyten nach Stimulation

Stimuliert wurde mit je 1 mg/ml Prolastin® oder chemisch oxidiertem AAT.

Kontrolle = RPMI-Zellmedium, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, positive Kontrolle, Prolastin® = unbehandeltes AAT, oxAATc = chemisch oxidiertes Prolastin®, Gesund = gesunde Kontrollgruppe (n = 11), Nicht-substituiert = Patienten ohne Infusions- bzw. Substitutionstherapie (n = 8), Pre Substitution = Patienten vor AAT-Infusion (n = 8), Post Substitution = Patienten nach AAT-Infusion (n = 8); *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001

Integrin-Molekülen erlauben PMNs nach Aktivierung, unter anderem als Reaktion auf inflammatorische Stimuli, die Interaktion mit der extrazellulären Matrix und anderen Zellen. Des Weiteren sind sie wichtiger Bestandteil und Initiator der Zell-Degranulation und Oxidanzien-Produktion von PMNs.

Isolierte PMNs der vier unterschiedlichen Vergleichsgruppen wurden für diesen Versuch mit den unterschiedlichen Formen des AATs inkubiert und die Anzahl adhärenter Zellen quantifiziert. In der gesunden Probandengruppe (n = 11) zeigten die PMNs nach Kontroll-Behandlung eine um 11,02 % geringere Adhäsion als nach PMA-Behandlung [8,137 % (SD = 4,649) vs. 19,16 % (SD = 11,36), p = 0,0015]. Die Prolastin®-Behandlung hingegen bewirkte eine um 0,94 % signifikant höhere Adhäsion der PMNs [8,137 % (SD = 4,649) vs. 9,073 % (SD = 4,791), p = 0,0061]. In der

nicht-substituierten Patientengruppe ($n = 8$) lag die Adhäsion nach PMA-Behandlung um 20,86 % signifikant höher als nach Kontrollbehandlung [32,84 % (SD = 18,08) vs. 11,98 % (SD = 10,18), $p = 0,0078$]. Entsprechend war sowohl vor Substitution (pre, $n = 8$), als auch nach Substitution (post, $n = 8$) die Adhäsion unter PMA-Behandlung gegenüber der Kontroll-Behandlung signifikant um 24,02 % bzw. 17,38 % erhöht [32,57 % (SD = 17) vs. 8,55 % (SD = 3,671), $p = 0,0039$ bzw. 28,68 % (SD = 10,36) vs. 11,3 % (SD = 3,556), $p = 0,0016$]. Die Prolastin®-Behandlung zeigte, sowohl in der substituierten Patientengruppe (post) als auch in der gesunden Probandengruppe, eine um 1,9 % bzw. 0,94 % signifikant erhöhte neutrophile Adhäsion im Vergleich zur Kontroll-Behandlung [11,3 % (SD = 3,556) vs. 13,2 % (SD = 4,203), $p = 0,0365$ bzw. 9,073 % (SD = 4,791) vs. 8,137 % (SD = 4,649), $p = 0,0061$]. Gruppenübergreifend konnte nach oxAATc-Behandlung eine um 4,33 % signifikant stärkere Adhäsion der substituierten Patientengruppe (post) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden [12,63 % (SD = 4,014) vs. 8,301 % (SD = 4,564), $p = 0,0466$].

Sowohl die Behandlung mit Prolastin® als auch mit oxAATc führte zu keiner erhöhten, mit der Positiv-Kontrolle vergleichbaren, Adhäsion der PMNs. Zwischen der Prolastin®- und oxAATc-Behandlung kam es, außer in der Gruppe der substituierten Patienten (pre), zu keinen signifikanten Unterschieden. Nach Prolastin®-Stimulation wurde im Vergleich zur Kontroll-Behandlung eine leicht erhöhte Adhäsion in der gesunden Kontrollgruppe sowie den Patienten nach Substitution (post) beobachtet.

4. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es die Auswirkungen der Substitutionstherapie auf die Aktivierung und Degranulation von PMNs zu beobachten. Im Anschluss versuchten wir die Effekte der biologischen Marker auf das infundierte AAT im Serum erkrankter Patienten nachzuvollziehen und diese *ex vivo* zu überprüfen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Infusion von Prolastin® zu einer kurzzeitigen Aktivierung der PMNs in Form einer Degranulation von MMP-9 und MPO führt, im Verlauf aber ein Absinken beider Serummarker unter die Werte nicht-substituierter Patienten beobachtet werden konnte. Sowohl MPO als auch MMP-9 fielen unter die Ausgangswerte an Tag 1, ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nur im Falle der MPO. Diese Trends konnten beispielhaft durch die Wochenverläufe zweier Patienten bestätigt werden. Bei den weiteren Serumanalysen fiel eine zunehmende Komplexierung und Oxidation des infundierten AATs auf. In den *ex vivo* Versuchen bestätigte sich die vermehrte Degranulation von MMP-9 und MPO nach Stimulation mit Prolastin® bzw. oxAATc, während die Adhäsion der PMNs als Zeichen einer unspezifischen Aktivierung unverändert blieb.

4.1 Was geschieht mit dem infundierten α 1-Antitrypsin – Abbau, Komplexierung und/oder Oxidation?

Nach Substitutionstherapie (post) kam es bei den substituierten Patienten zu einem signifikanten Anstieg des nephelometrisch bestimmten Serum-AATs. An Tag 3 war die AAT-Konzentration bereits um 47,69 Prozent abgefallen. Der exemplarische Wochenverlauf des substituierten Patienten verdeutlicht, dass es nach dem anfänglich starken Abfall der gesamten AAT-Konzentration von 30,7 Prozent an Tag 1 post, bzw. 43,93 Prozent an Tag 3, zu einer gleichmäßigeren Abnahme der Serumkonzentration über den Rest der Woche kam (Abbildung 2 und Abbildung 3). Der für die Lunge protektive, hypothetisch angenommene Serum-Schwellenwert von 0,5 g/l wurde weder bei den Serumanalysen der Patientengruppe 1, noch beim Patienten des Wochenverlaufs unterschritten und bestätigt die Ergebnisse der Literatur sowie der

korrekten AAT-Dosis-Einstellung der Patienten (100,251). Alle nicht-substituierten Patienten lagen unterhalb dieser Schwelle, zeigten nur geringe Schwankungen und sind folglich einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Lungenemphysems ausgesetzt (223).

Die Gründe für den unregelmäßigen und zu Beginn des Wochenverlaufs vermehrten Verlust des AATs sind unklar, die normale Halbwertszeit liegt laut Herstellerangaben bei 4,5 Tagen (251). Unter vermehrtem, systemischem Stress kommt es im Körper zu einem erhöhtem Verbrauch bzw. Umsatz von AAT. Gegenregulatorisch würde bei einem Pi*M-Träger die Präsenz von IL-6, NE, LPS und TNF- α eine vermehrte Produktion von AAT initiieren. Eine nachfolgende Veränderung der Glykosylierung würde im Anschluss eine erhöhte Stabilität und Flexibilität des Proteins bewirken (80,120,184–186). Die bei den Patienten vorliegende systemische Aktivierung der PMNs kann aufgrund des hereditär bedingten Defizits nicht durch erhöhte Synthese von AAT in den Hepatozyten abgepuffert werden. Dies wäre ein Erklärungsansatz für einen erhöhten Verlust von α 1-Antitrypsin innerhalb der ersten drei Tage bei gleichzeitig erhöhten Degranulationsmarkern. Eine weitere Option wäre ein vermehrter Abbau des AATs durch die zwei Stunden nach Infusion erhöhte MMP-9. Diese kann AAT durch die endständige Abspaltung eines 4 kDa großen Peptids deaktivieren und den Aufbau eines gewebschädigenden Milieus fördern (9). *In vitro* Versuche zeigen allerdings, dass diese Spaltung für höchstens 20 Prozent des gesamten AAT-Proteinverlusts innerhalb von 24 Stunden verantwortlich gemacht werden kann, was diese Hypothese eher fraglich erscheinen lässt (243).

Auffällig ist, dass der Abfall bzw. die Dynamik des monomeren AATs im Wochenverlauf (Abbildung 3) und den Patientenkohorten den nephelometrischen Serum-Messungen ähnelt (3,34-facher Anstieg bzw. 3,75-facher Anstieg; Abbildung 2 bzw. Abbildung 9.2). Der Anstieg des komplexierten AATs wurde nephelometrisch nicht detektiert, obwohl im Serum weiterhin messbares AAT vorliegt. Im Wochenverlauf des nicht-substituierten Patienten waren hingegen keine starken Unterschiede in der Fluktuation der beiden Fraktionen erkennbar. Es konnte gezeigt werden, dass die nephelometrische Messung ausschließlich monomeres AAT im Serum der Patienten

detektiert, während komplexiertes, höhermolekulares AAT von der nephelometrischen Messung ausgeschlossen ist (76). Dies würde bedeuten, dass der nephelometrische Abfall nicht auf einen Verlust *per se* zurückzuführen ist, sondern auf eine fehlerhafte oder mangelhafte Detektion des komplexierten bzw. veränderten AATs.

Diese Annahme passt gut zu der in dieser Studie beobachteten und Literatur bekannten Oxidation von AAT durch MPO sowie der anschließenden Komplexierung des AATs (157). Die vermehrte Polymerisierung der Z-AAT-Form nach Oxidation konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, während eine verstärkte Komplexierung der M-AAT-Form unter physiologischen Bedingungen bisher nicht bekannt ist (3). Allerdings liegen bis zu 30 Prozent des infundierten Prolastins® bereits bei Infusion schon komplexiert vor (123). Für eine Komplexierung des AATs nach einer Oxidation sprechen außerdem der zeitgleiche Anstieg des komplexierten AATs (Abbildung 10) und das vermehrt im Serum vorkommende methioninsulfoxid-positive AAT nach Substitution, auf das später eingegangen wird (Abbildung 11.2).

Zwei Stunden nach Infusion kam es bei substituierten Patienten zu einem 1,28-fachen Anstieg des AATs mit einer Masse von >100 kDa. Der Anteil des komplexierten AATs war auch an Tag 3 gegenüber dem Ausgangsniveau (Tag 1 pre) und den nicht-substituierten Patienten noch erhöht. Nur vor Substitution (pre) gab es zwischen substituierten und nicht-substituierten Patienten keinen Unterschied (Abbildung 10). Im Wochenverlauf des substituierten Patienten wurde der Höchstwert der progredienten Komplexierung erst an Tag 5 erreicht (Abbildung 12). Hier ist wahrscheinlich von einer individuellen Schwankung auszugehen. Beim gleichen Patienten erreicht auch die Fraktion des methioninsulfoxid-positiven AATs erst an Tag 5 bzw. 6 ihr Maximum. Wie zuvor erwähnt, ist eine Verschiebung von monomerem hin zu komplexiertem AAT wahrscheinlich. Vor kurzem zeigte unsere Arbeitsgruppe bereits, dass es zwei Stunden nach Prolastin®-Infusion zu einem Anstieg des polymerisierten AATs im Serum und einem Abfall an Tag 3 kommt. Ursächlich wurde hier das zugeführte AAT für die Anstiege der Serumkonzentrationen verantwortlich gemacht (203).

Die zweischrittige, konzentrationsabhängige Polymerisierung von aus humanem Plasma aufgereinigtem Z-AAT wird bereits von Dafforn *et al.* erwähnt, allerdings nur unter unphysiologischen Bedingungen von 45 °C (53). Mulgrew *et al.* können dahingegen eine Polymerisierung von Z-AAT unter vergleichsweise physiologischen Bedingungen in der Lunge beobachten (165). Die verhältnismässig niedrigen Anteile komplexierten AATs bei nicht-substituierten Patienten schließen allerdings eine alleinige Z-AAT Komplexierung bei der substituierten Patientengruppe aus. Eine vermehrte Polymerisierung von M-AAT konnte bisher nur bei Temperaturen von über 60 °C beobachtet werden, gleichzeitig sind im humanem Plasma von PI*MM Probanden auch nur sehr geringe Mengen polymerisierten M-AATs messbar (5,84). Die industrielle Herstellung von Prolastin® beinhaltet unter anderem eine Erhitzung des human-gepoolten Plasmas auf 60 °C für min. zehn Stunden zur Inaktivierung möglicher viraler Kontamination (231). Ein verstärkt polymerisierter Anteil des Prolastins® konnte *in vitro* bereits gezeigt werden (203). Bis zu acht Prozent des Prolastins® liegen demnach in dieser Form vor, bis zu 34 Prozent haben ihre Funktion als Inhibitor bereits verloren (144). Die hohen, während des Erhitzungsprozesses vorliegenden Konzentrationen könnten demnach zu einer Komplexierung des Prolastins® geführt haben und den Anstieg des höhermolekularen AATs erklären. Hierdurch wird aber nicht die über den Wochenverlauf stattfindende Abnahme monomeren, bzw. Zunahme komplexierten AATs geklärt (Abbildung 12.2). Eine eindeutige Aussage, ob es sich bei den Komplexen um Polymere handelt, ist limitiert durch die hier angewandte Methodik. Echte Polymere zeigen auch im *Transverse Urea Gradient (TUG)* Gel keine Änderung der *loop-sheet* Polymerisierung, während es bei nur heterogener Oligomerisierung zu einer Entfaltung kommt und die Bestandteile ihrer einzelnen Masse entsprechend laufen (49,65). Darüber hinaus sind Interaktionen bzw. Komplexierungen von AAT mit anderen Bestandteilen des Serums, z. B. LDL, Ig-A, IL-8 und Prohepcidin, bekannt, die in der nativen PAGE nicht ausgeschlossen werden können (19,155,180,235,237).

Die genaue Ursache für die Komplexierung ist unklar. Wie bereits erwähnt, ist eine Komplexierung der M-AAT-Form unter physiologischen Umständen sehr selten und eine alleinige Zufuhr der Komplexe allein durch Infusion aufgrund der zunehmenden

Komplexe über den Wochenverlauf hinweg unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit ist die Heteropolymerisierung von oxidiertem Z- und M-AAT. Mahadeva *et al.* zeigen, dass eine Heteropolymerisierung mit *loop-sheet* Polymerisierung zwischen der Z-Variante und der S-Variante möglich ist, trotz der weitaus geringeren Tendenz der S-Variante zur Polymerisierung (66,151). Desweiteren erhöht der Oxidationsprozess die Polymerisierung von Z-oxAAT innerhalb von 24 Stunden um das Zehnfache, für M-oxAAT konnte dies bisher noch nicht gezeigt werden (3). Da die Oxidation unspezifisch abläuft, hätte eine Freisetzung der MPO sowohl eine Bildung von Z-oxAAT, als auch M-oxAAT zur Folge. Diese könnten im Anschluss an die Oxidation komplexieren und so die Bildung der vorgefundenen Komplexe von >100 kDa erklären.

Aufgrund der verwendeten Antikörper ist eine Unterscheidung der gebildeten Komplexe zwischen M-oxAAT und Z-oxAAT nicht möglich. Für zukünftige Untersuchungen wäre es von Interesse zu untersuchen, ob oxidiertes, infundiertes M-AAT oder oxidiertes Z-AAT für die Komplexbildung im Serum verantwortlich ist, bzw. ob beide Formen maßgeblich an der Komplexbildung beteiligt sind.

Die Aktivierung von PMNs hat unter anderem eine Degranulation von MPO aus den primären Granula zur Folge, welches in der Folge AAT oxidieren kann (95). Zusätzlich ist AAT in einem inflammatorischen Milieu anfälliger für eine Oxidation, dies zeigt sich unter anderem in der Korrelation erhöhter MPO-Werte und vermehrt anfallendem oxAAT (96,207). Im durchgeführten methioninsulfoxid-positiven *Western Blot* wurden die Anteile des oxAATs am gesamten AAT beobachtet (Abbildung 11). Die Detektion des aufgeführten Proteins in der SDS-PAGE bei 52 kDa und die Methioninsulfoxid-Positivität lassen davon ausgehen, dass es sich um eine oxidierte Form des AATs handelt. Auffällig waren die in der nativen PAGE vorkommenden hochmolekularen Anteile von >100 kDa, welche in der SDS-PAGE nicht sichtbar waren. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich dabei um komplexiertes, also nicht-kovalent gebundenes, und gleichzeitig oxidiertes AAT handelt (191). Die um das 1,5-fach niedrigeren oxAAT-Anteile der nicht-substituierten Patienten sind dabei eher auf die insgesamt erniedrigte AAT-Serumkonzentration zurückzuführen, da die MPO-Serumwerte über die Woche betrachtet, gleichwertig bis höher liegen und

folglich auch bei diesen Patienten ein potentiell oxidatives Milieu vorliegt. Die Wochenverläufe der methioninsulfoxid-positiven *Western Blots* bestätigen die Messungen in den Patientenseren (Abbildung 12). Der relative oxAAT-Anteil stieg an Tag 5 und 6 auf sein Maximum und ist mit dem Wochenverlauf des komplexierten AATs vergleichbar, welcher sein Maximum ebenfalls an Tag 5 und 6 erreichte. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist auch hier davon auszugehen, dass es sich bei dem hochmolekularen, methioninsulfoxid-positiven AAT um komplexiertes und oxidiertes AAT handelt.

In der Vergangenheit wurden, neben dem Verlust zur Inhibition der NE, pro-inflammatorische Effekte von oxAAT diskutiert. Moraga und Janciauskiene beobachten beispielsweise eine Hochregulation der ROS-Bildung durch Monozyten nach deren Stimulation mit oxAAT. Diese stellt einen Erklärungsansatz für die Aufrechterhaltung der fortwährenden oxAAT-Produktion dar (164). Eine Arbeitsgruppe um Alam *et al.* zeigt, dass die Polymerisation von oxAAT in Lungenepithelzellen um das Zehnfache beschleunigt abläuft und eine Verstärkung des PMN-Influxes zur Folge hat (3). Dieser Effekt ist, zumindest teilweise, der Verwendung von Z-AAT bei der Oxidation zuzusprechen, da dieses stärker zur Polymerisierung neigt als das in dieser Studie hergestellte M-oxAAT. Unterbindet man die Polymerisierung des Z-oxAATs, kommt es zu einer vergleichsweise geringeren Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine (4). Li *et al.* verwenden bei der oxAATc-Herstellung Prolastin® als Grundlage. Die in der Studie beobachtete vermehrte Freisetzung von MCP-1 und IL-8 ist aber beschränkt auf Bronchialepithelzellen, die erst im späteren Verlauf zu einer Einwanderung von PMNs und Monozyten führen würde (136). Im Kontrast dazu zeigen einige Gruppen, dass bestimmte anti-inflammatorische Effekte, wie die Freisetzung von IL-10 oder die TNF- α -induzierte Selbstexpression von AAT, nicht an die inhibitorische Funktion gegenüber Serinproteasen gekoppelt sind und so einer weiteren Eskalation der Entzündung entgegenwirken (105,225). Die Auswirkung von oxAATc in Bezug auf die Degranulation von isolierten PMNs wurde bisher noch nicht gezeigt. Die beobachtete Freisetzung von MPO, MMP-9 und IL-8 *ex vivo* bestätigt die in den Patientenseren beobachtete vermehrte Freisetzung der beiden Marker zwei Stunden nach Infusion. Da es durch die Stimulation von oxAATc aber zu keiner, im

Vergleich zur Prolastin®-Stimulation, verstärkten Degranulation kommt, ist hier von keinem zusätzlich pro-inflammatorischen Effekt von oxAATc auf PMNs auszugehen.

Für substituierte Patienten ist durch die Oxidation des infundierten Prolastins® folglich mit keinem zusätzlich pro-inflammatorischen Effekt zu rechnen. Um die durch Verunreinigung des Prolastins® induzierten Effekte auf die PMNs beurteilen zu können, sollte in zukünftigen Studien reineres AAT zur Stimulation benutzt werden.

Theoretisch kann es *in vivo* durch die, vor allem in PMNs vorkommende, Methioninsulfoxid-Reduktase zu einer Rücküberführung des oxAATs zu AAT kommen (207). Unklar ist, ob dieser Prozess auch in entzündetem Gewebe stattfinden kann. Zusätzlich ist anzunehmen, dass die andauernde Produktion von ROS die Reparaturkapazitäten der Reduktase übersteigt. (30). Die Halbwertszeit von extern appliziertem oxAAT im Blut von gesunden Ratten wird mit 170 min angegeben (83). Würden ähnliche Voraussetzungen für den menschlichen Organismus gelten, wäre oxAAT hauptsächlich ein Indikator für die Freisetzung von ROS (237). In dieser Studie konnte die progrediente Bildung von oxAAT über einen Zeitraum von bis zu einer Woche beobachtet werden. Dies hängt zum einen mit der *in vivo* andauernden, kumulativen Oxidation des AATs im Patienten zusammen, zum anderen wird in der Literatur eine erhöhte Stabilität von AAT durch Komplexbildung mit anderen Proteinen angenommen (53).

4.2 Welche Auswirkungen hat die Substitutionstherapie auf die Aktivierung, Degranulation und Adhäsion der polymorph-nukleären Granulozyten?

4.2.1 *In vivo*

Die Substitutionstherapie führte zu einem akuten Anstieg von MPO und MMP-9 zwei Stunden nach Prolastin®- bzw. AAT-Substitution (Abbildung 4 und Abbildung 5). Spätere Messungen zeigen, dass beide Biomarker nach drei Tagen unter den Ausgangswert vor der Substitution (Tag 1 pre) sinken und damit niedriger liegen, als die Werte nicht-substituierter Patienten. Zusätzlich zeigen die erhöhten MMP-9 und MPO-Spiegel eine Korrelation mit den gestiegenen AAT-Serumwerten.

MPO gilt als Marker der neutrophilen Degranulation. Sie wird ausschließlich in den Vorläuferzellen der PMNs produziert und anschließend in primären azurophilen Granula, gemeinsam mit NE, Proteinase-3 und Cathepsin G, gespeichert (95). MMP-9 hingegen wird, im Gegensatz zu anderen Zelltypen, erst in späteren PMN-Entwicklungsstadien produziert. Eine gleichzeitige Produktion des Inhibitors TIMP-1 findet nicht statt (156). Die enge Assoziation zwischen erhöhten MMP-9-Spiegeln und vermehrten PMNs weist diese als die Hauptproduzenten von MMP-9 aus (209,239). Auch die beobachtete Korrelation zwischen steigenden MMP-9- und MPO-Spiegeln in kurzem zeitlichem Abstand zur Substitution bestätigt, dass PMNs die Hauptproduzenten dieser inflammatorischen Marker sind (Abbildung 6). Die transiente Leukozytose nach Infusion (Tabelle 3) ist wahrscheinlich durch die MMP-9 mitregulierte Chemotaxis bedingt (172). Segura-Valdez *et al.* zeigten bereits auf immunhistochemischer Basis, dass die lokal in emphysematösen Lungen erhöhten MMP-2 und MMP-9-Werte von aktivierten PMNs stammen (209). Anhand dieser Studie konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Prolastin®-Infusionstherapie zu einer transienten Erhöhung von MMP-9 und MPO führt.

Es ist hervorzuheben, dass sich die Erhöhung der MPO der substituierten Patienten über die Spiegel der nicht-substituierten Patienten auf den Zeitpunkt zwei Stunden nach Substitution, sowohl bei den Serumanalysen der Patientengruppe 1, als auch bei den Wochenverläufen, beschränkte (Abbildung 4 und Abbildung 7). Zu anderen Zeitpunkten differierten die Werte der substituierten Patienten nicht oder waren sogar niedriger als die der Nicht-substituierten. Kurzzeitig ansteigende MPO-Spiegel können im Anschluss zu der oben erwähnten Oxidation und Komplexierung des infundierten AATs führen. Neben der ROS Produktion kann MPO die Integrin-vermittelte Zell-Zell-Interaktion beeinflussen und dadurch die Migration und Infiltration der PMNs in entzündetes Gewebe fördern (114). Dies hätte im weiteren Verlauf auch eine vermehrte Destruktion der EZM in der Lunge zur Folge (238). Aufgrund der nur kurzzeitigen Erhöhung der MPO-Spiegel und der nachfolgend andauernden Stabilisierung bei niedrigeren Spiegel ist aber nicht von einem vermehrten Gewebsabbau gegenüber den nicht-substituierten Patienten auszugehen. Über die

Woche betrachtet, kann man daher für substituierte Patienten von einem positiven Einfluss durch den prolongierten MPO-Abfall im Serum ausgehen.

In der Literatur gehen einige Arbeitsgruppen von einer β_2 -Integrin-abhängigen Komponente der MMP-9-Freisetzung aus den tertiären Granula, bzw. einer β_2 -Integrin-unabhängigen Freisetzung über die Proteinkinase C aus (41). Ob dies der normale Signalweg der neutrophilen MMP-9 Freisetzung ist, bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung. Für zukünftige Arbeiten wäre es von Interesse den Zusammenhang zwischen der individuellen Variabilität der neutrophilen Degranulation und den klinischen Folgen der Prolastin®-Infusionstherapie weiter zu untersuchen. Eine vor kurzem erschienene Studie von Bradley *et al.* befasst sich mit der Rolle von MMP-9 in der Pathogenese von Influenza-Virus-Infektionen. Diese zeigt, dass MMP-9 für die Migration der PMNs im Respirationstrakt notwendig ist und an der viralen Beseitigung beteiligt ist, z. B. durch die Generierung von Substraten für die Antigenpräsentation der T-Zellen (27,174). Die Notwendigkeit von MMP-9-gesteuerter Immunzellregulation lässt mutmaßliche therapeutische Vorteile der Prolastin®-Infusionstherapie bei anderen viralen Infektionen vermuten. Dafür sprechen mehrere klinische Studien, die eine Abnahme der klinischen Exazerbationsfrequenz und des Schweregrades aufzeigen, bzw. eine Verlangsamung der Abnahme der Lungenfunktion andeuten (60,61,137,262).

PMNs sind die einzigen Zellen im Körper die MMP-9 ohne gleichzeitige Sekretion des natürlichen Inhibitors TIMP-1 produzieren und freisetzen mit dem es normalerweise zu einer Komplexbildung und Inaktivierung der Protease kommt (156,173). Aufgrund des idealen, TIMP-freien Milieus wird PMNs und MMP-9 eine entscheidende Bedeutung in der Angiogenese zugesprochen (8,174). Die Rolle von MMP-9 bei der Degradation der EZM und der Unterstützung des Gewebeumbaus ist bekannt, gleichzeitig kommt es aber auch zu einer Aktivierung und Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie dem an die EZM-gebundenen *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A) (18,211). Kasahara *et al.* zeigen, dass eine Blockade des VEGF-Rezeptors zu einer Apoptose der alveolaren Epithelzellen und in der Folge zur Ausbildung eines Emphysem führen, zusätzlich entsteht durch die Blockade vermehrt oxidativer Stress (118,236). Eine

intratracheale VEGF-Instillation bei Mäusen bewirkt hingegen eine verbesserte Lungenreifung und Regeneration (47). In einer von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Studie konnten wir einen leichten Anstieg der VEGF-Spiegel nach Prolastin®-Infusion beobachten (203). Die beobachtete, kurzzeitige Erhöhung der MMP-9-Spiegel könnte folglich für die zuvor ermittelte Erhöhung der VEGF-Spiegel mitverantwortlich sein und so an den permanenten Reparaturprozessen der Lunge und der Homöostase beteiligt sein.

Andererseits weisen mehrere Arbeitsgruppen im Hinblick auf klinische Endpunkte nach, dass persistierend erhöhte Plasma-MMP-9-Werte bei COPD Patienten mit niedrigen FEV₁-Werten, FVC, Carbonmonoxid-Transferfaktor, erniedrigter Sauerstoffsättigung in Ruhe und vermehrten Exazerbationen über ein Jahr assoziiert sind (28,171). Schnelle Abfälle der FEV₁ gehen auch mit erhöhten PMN-Werten einher, die eine Quelle für weitere MMP-9-Degranulation sein können (93). Zusätzlich korrelieren erhöhte MMP-9-Plasmawerte mit vermehrten Obstruktionen der Luftwege bei COPD-Patienten (241). Erhöhte Sputumkonzentrationen von MMP-9 gehen mit erniedrigten FEV₁/FVC-Werten einher, bzw. die MMP-9-Sputumspiegel reflektieren den strukturellen Gewebsumbau in der HR-CT (16,192). Wie weiter oben erwähnt, folgt auf die von uns beobachtete, schnelle und kurzzeitige Freisetzung von MPO und MMP-9 eine Phase relativ erniedrigter Serumwerte. Insbesondere die MMP-9-Spiegel waren vor und drei Tage nach der Substitution signifikant niedriger als die Spiegel nicht-substituierter Patienten, ansonsten differierten sie nicht signifikant im Vergleich zu den nicht-substituierten Patienten (Abbildung 5). Dem Wochenverlauf zu entnehmen erfolgten die einzigen Anstiege über das Niveau des nicht-substituierten Patienten erst am Tag der erneuten Infusion an Tag 8 pre bzw. post (Abbildung 8). Im Vordergrund steht die durch die Prolastin®-Substitutionstherapie herbeigeführte Senkung und Stabilisierung der MPO- und MMP-9 Serumwerte gegen Mitte der Woche. Dies stimmt auch mit neueren Beobachtungen der Gruppe um Bergin *et al.* überein die zeigen, dass AAT auch kurzzeitige Effekte auf die Freisetzung von MMP-9 ausübt: zirkulierende MMP-9 Plasmaspiegel sind an Tag 2 nach Substitutionstherapie um 25 Prozent geringer als an Tag 7. Die zirkulierenden PMNs zeigen demnach Mitte der Woche eine verminderte Neigung zur Degranulation (20). Darüber hinaus konnten

wir in einer vorigen Studie zeigen, dass die Infusionstherapie eine signifikante Reduktion der IL-8-Serumwerte *in vivo* bewirkt sowie eine Reduktion von TNF- α , IL-1, IL-6 und des *Monocyte-Chemotactic-Protein-1* (MCP-1) (116,176,203).

Ob die kurzzeitigen, infusionsbedingten Erhöhungen oder die über die restliche Woche andauernde Senkung der Biomarker eine Rolle für den langfristigen Verlauf des Patienten spielen, muss durch klinische Studien geklärt werden.

4.2.2 *Ex vivo*

Die Annahme einer transienten Erhöhung von MMP-9 und MPO durch die Prolastin®-Infusionstherapie wird auch durch die durchgeführten *ex vivo* Versuche gestützt. Die Stimulation von isolierten PMNs mit Prolastin® zeigte in allen untersuchten Probandengruppen eine signifikant vermehrte Freisetzung von MPO und MMP-9 (Abbildung 17 und Abbildung 18). Dabei ist die Funktionalität des Proteins für die Degranulation unbedeutend. Sowohl Prolastin®, als auch oxAATc verursachten in allen Gruppen signifikante Anstiege der MPO und MMP-9-Degranulation gegenüber der Kontrolle, während zwischen den beiden Stimulationen selbst kein Unterschied bestand. Die Daten führen folglich zu der Annahme, dass die Prolastin®-Infusionstherapie zu einer zumindest kurzfristigen Degranulation der PMNs *in vivo* führt. Dahin deuten auch die Korrelationen zwischen steigenden AAT-Serumwerten und erhöhten MMP-9 bzw. MPO-Serummarkern (siehe 3.2.2.1).

Um die spezifischen Auswirkungen des in den Serumuntersuchungen detektierten oxAATs auf die PMNs zu untersuchen, wurde oxAAT in dieser Studie künstlich für die *ex vivo* Stimulation von PMNs nach etablierten Verfahren hergestellt (136). Es ist anzumerken, dass es sich bei dem verwendeten AAT aus Prolastin® um M-AAT handelt und es folglich zur Bildung von M-oxAATc kommt. Der Erfolg des Oxidationsprozesses wurde anschließend in zwei unterschiedlichen Verfahren überprüft. Die qualitative Überprüfung demonstriert den in der Literatur bekannten Fähigkeitsverlust von AAT zur Inhibition der NE (230). Nach Inkubation der NE mit oxAATc kommt es daraufhin zum mit der Kontrolllösung vergleichbaren Substratumsatz (Abbildung 15). In der

Prolastin®-Lösung befindliches, unbehandeltes AAT ließ hingegen keinen Umsatz der NE zu, sodass von einer Inhibition der NE durch AAT auszugehen ist. Zusätzlich wurde der Oxidationsprozess durch die fehlende Komplexbildung zwischen oxAATc und porciner Pankreaselastase nachgewiesen (Abbildung 16). Diese stimmt mit den Angaben der Literatur überein: während es nach einer Inkubation von oxAATc mit NE zu einer instabilen Komplexbildung kommt, findet zwischen oxAATc und Pankreaselastase keine Komplexbildung statt (178). In einer vorherigen Studie wurde bereits der chemische, mittels N-Chlorosuccinimid, und der *in vivo*-stattfindende, durch MPO-Freisetzung aus aktivierten PMNs, Oxidationsprozess verglichen. Diese zeigen eine große Ähnlichkeit in den Eigenschaften der beiden unterschiedliche oxAAT-Formen (14,178).

Die Stimulation der aus Probanden- bzw. Patientenblut isolierten PMNs mit Prolastin® in Reinform bzw. oxAATc zeigte für MPO keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen. Für MPO war die Degranulation unter Prolastin®-Stimulation in der Gruppe der Nicht-substituierten bzw. Patienten nach Substitution um 27,35 Prozent respektive 32,82 Prozent höher (Abbildung 17 und Abbildung 18). Die mit 1 mg/ml relativ hohe Konzentration von oxAATc wurde bewusst gewählt, da in der Literatur Anteile oxidierten AATs zwischen 10 – 41 Prozent des gesamten AATs diskutiert werden (43,105). Diese Werte sprechen auch für die Annahme, dass die Schwere der Entzündung mit dem Ausmaß der AAT-Inaktivierung korreliert (14,43,105). Um die Effekte beider Fraktionen vergleichen zu können, wurden für oxAATc und Prolastin® die gleichen Konzentrationen gewählt.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die teilweise signifikanten Unterschiede der MPO-Degranulation lässt sich aus dem Aktivierungsprozess der PMNs ableiten. Die Granula der PMNs fusionieren auf ihrem Weg zum Ort der Inflammation in einer definierten Reihenfolge mit der Zellmembran: 1. Sekretorische Vesikel, 2. Tertiäre/Gelatinase Granula, 3. Sekundäre Granula, 4. Primäre/azurophile Granula (17,210). Vor der Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumspiegel und einer rezeptorgesteuerten Aktivierung intrazellulärer Signalwege (125). Die einzelnen Granula reagieren

unterschiedlich sensitiv auf die Kalziumspiegel. Die Rekrutierung primärer Granula setzt höhere Spiegel voraus (24). Die in den tertiären Granula enthaltenen Gelatinasen wie MMP-9 und Membranrezeptoren werden für die frühe Adhäsion, Transmigration und Diapedese der Zelle benötigt und daher als Erste mobilisiert. Im natürlichen Milieu kommt es erst beim Zusammentreffen mit Pathogenen zur Degranulation der primären Granula (73). Sowohl Prolastin®, als auch oxAATc führen zu einer gleichmäßigen Degranulation von MMP-9 aus den tertiären Granula. Anders verhält es sich bei der Degranulation von MPO. Die verminderte MPO-Degranulation könnte folglich mit einer zahlenmäßig geringeren Rekrutierung primärer Granula aufgrund einer geringeren Aktivierung durch oxAATc zusammenhängen. Außerdem geht die Degranulation primärer Granula langsamer vonstatten als bei tertiären Granula (17). Es könnte sich demnach auch um eine ausschließlich zeitliche Verzögerung der MPO-Freisetzung handeln. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Bergin *et al.* zeigt, dass es *in vivo* bereits bei nicht-stimulierten ZZ-PMNs zu einer vermehrten Degranulation der sekundären und tertiären Granula nach TNF- α -Stimulus kommt. Die Autoren gehen hier von einer Voraktivierung der Zellen *in vivo* aus (20,198). Die Veränderung durch den TNF- α -Stimulus wirkte sich außerdem auf das zelluläre Abwehrverhalten und die Apoptoserate der PMNs aus (101). Eine Voraktivierung konnte bereits bei PMNs aus den Lungen von Patienten mit einer systemisch inflammatorischen Grunderkrankung beobachtet werden (77). Es ist daher davon auszugehen, dass PMNs von AATM-Patienten, bedingt durch den intrazellulären ER-Stress und den extrazellulären Mangel, mit einer veränderten Signalgebung und Aktivierbarkeit reagieren. Diese könnte bei den in der Erkrankung fortgeschrittenen, substituierten Patienten der Grund für die in dieser Studie beobachtete vermehrte MPO-Degranulation nach Prolastin®-Stimulus sein (Abbildung 17). Bei PMNs vor und zwei Stunden nach Infusion war gegenüber der gesunden Kontrollgruppe eine vermehrte Degranulation der primären Granula zu beobachten. Bei Bergin *et al.* führt die Behandlung mit AAT bei ZZ- und MM-PMNs zu einer dosisabhängigen Reduktion der Degranulation. Dabei ist anzumerken, dass die Stimulation nach Vorinkubation mit TNF- α und anschließender Anwendung von chemisch reinem AAT geschieht, die in unserem Versuchsaufbau so nicht gegeben war, bzw. in unserer Studie das in der klinischen Praxis angewandte

Prolastin® genutzt wurde. Die Gründe für dieses Vorgehen werden im weiteren Verlauf diskutiert (siehe 4.5).

Als dritter Marker der Aktivierung wurde IL-8 im Überstand gemessen, da es als wichtigstes chemotaktisches Interleukin weitere PMNs rekrutiert und so den lokalen und systemischen Entzündungsprozess unterhält. Zusätzlich stimuliert IL-8 die Degranulation von MMP-9, welches wiederum die Wirkung von IL-8 auf die PMNs durch eine Spaltung um das Zehnfache potenzieren kann (174,216). In diesem Zusammenhang übt reines AAT einen inhibitorischen Effekt auf die IL-8-Freisetzung durch PMNs aus (2). Das im Serum gemessene, systemische IL-8 war nicht über den Normbereich erhöht (Tabelle 5). Die relativ erhöhten Werte substituierter Patienten vor Infusion sprechen für einen mit MPO bzw. MMP-9 vergleichbaren Wochenverlauf: mit Abfall des AATs im Serum kam es zu einem relativen Anstieg der IL-8-Werte. Nach Substitution kam es zu einem leichten, aber nicht-signifikanten, Abfall von IL-8. Den gleichen Abfall von IL-8 nach Substitution beobachteten Stockley *et al.* im Sputum von AATM-Patienten (220). In der *ex vivo* Stimulation war eine vermehrte Freisetzung von IL-8 beobachtbar, zwischen oxAATc und Prolastin®-Behandlung waren keine Unterschiede sichtbar (Abbildung 19). Die vermehrte Freisetzung von IL-8 nach Prolastin®-Behandlung wird bereits in einer anderen Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe gezeigt (203). Das wiederum spricht für eine, zumindest kurzzeitig lokale, Aktivierung der PMNs. Diese Aktivierung könnte in der Folge über den Erhalt der Entzündung einen Beitrag zur vermehrten Oxidation des AATs leisten. Eine mögliche Ursache hierfür ist die später diskutierte Verunreinigung der Infusionslösung mit Serumkomponenten (siehe 4.4).

Bevor es bei PMNs zu einer effektiven Degranulation kommen kann, ist eine Aktivitäts-abhängige Adhäsion über Integrine essentiell. Eine Degranulation von rollenden, adhären, nicht-aktivierten oder sich in Lösung befindlicher PMNs ist minimal (196). Während funktionelles AAT die Adhäsion von PMNs unterdrückt, können im inflammatorischen Milieu entstandene AAT-Spaltprodukte eine vermehrte Adhäsion und Aktivierung der PMNs bewirken (107). Al-Omari *et al.* zeigen, dass die herabgesetzte Adhäsion der PMNs wahrscheinlich mit der direkten Inhibition von

Calpain I zusammenhängt. Während die Adhäsion mit oder ohne Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) um bis zu 50 Prozent reduziert wird, kommt es stattdessen zu einer ungerichteten Migration der PMNs (2). In unserer Studie wurde die Adhäsion der PMNs nach Stimulation mit oxAATc bzw. Prolastin® überprüft (Abbildung 20). Im Allgemeinen führte die Stimulation mit Prolastin® oder oxAATc weder zu einer erhöhten, noch zu einer verminderten Adhäsion gegenüber den Kontrollstimulationen. Die oben erwähnte Voraktivierung der PMNs durch die Infusion, in Kombination mit der später diskutierten Verunreinigung der Infusionslösung durch Serumkomponenten (siehe 4.4) könnte zu der vermehrten Adhäsion nach Prolastin®-Stimulation in der Gruppe der Patienten nach Substitution geführt haben. Die Voraktivierung der PMNs substituierter Patienten erklärt auch die gruppenübergreifend vermehrte Adhäsion gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nach oxAATc-Stimulation. Auch nach kombinierter Stimulation von PMA mit Prolastin® bzw. oxAATc war keine Verminderung der Adhäsion gegenüber eines alleinigen PMA-Stimulus messbar (Daten nicht gezeigt). Es ist daher davon auszugehen, dass die in der Literatur beschriebene verminderte Adhäsion von der Präparation des AATs abhängig ist. Die von Al-Omari *et al.* beschriebenen Effekte werden zwar mit AAT aus einer Prolastin®-Lösung induziert, allerdings erfolgt zuvor eine Ultrazentrifugation der Infusionslösung mittels einer 30 kDa und 100 kDa Säule. Dieses Vorgehen hat eine Separation der übrigen Plasmabestandteile, z. B. komplexierten oder polymerisierten AATs, vom monomeren AAT zur Folge. Die Autoren werfen hier selbst die Frage auf, ob die Effekte auch mit nicht-separiertem Prolastin® reproduzierbar sind (2). Es ist zu vermuten, dass die anti-adhäsive Wirkung des AATs erneut überlagert wird von den zusätzlichen Bestandteilen des Infusionspräparates. Positiverweise hat hier die Stimulation mit der Prolastin®-Lösung aber keine Förderung einer Adhäsion zur Folge.

4.3 Ist die Myeloperoxidase nur Indikator eines systemischen, oxidativen Stresses?

In früheren Studien wurde MPO bereits als möglicher Marker des oxidativen Stresses diskutiert, der sowohl lokal, als auch systemisch bei COPD Patienten gegenüber gesunden Kontrollen deutlich erhöht ist (255). In einer neueren Studie kann

nachgewiesen werden, dass selbst Kinder mit Pi*ZZ-Genotyp im prä-emphysematösen Stadium vermehrt oxidative Stressmarker im Serum aufweisen, die bei gesunden Kontrollen und Kindern mit Pi*MZ/SZ Genotyp nicht messbar sind (68). Eine Meta-Analyse von Zhu *et al.* aus 24 Studien zeigt erhöhte MPO-Sputumwerte von COPD-Patienten gegenüber Kontrollen, insbesondere während Exazerbationen. COPD-Patienten mit AATM haben zusätzlich erhöhte MPO-Sputumwerte (258). Der Vorteil von MPO gegenüber der NE, ist die längere Halbwertszeit im Mikromilieu der Lunge, da sie nicht sofort durch AAT inaktiviert wird. Die NE ist beispielsweise im Sputum bis auf Exazerbationen nur sehr niedrig oder gar nicht messbar (94). Die MPO wird wie die NE in azurophilen Granula gespeichert, demzufolge entspricht die Menge degranulierter MPO der der NE (95). Ihre Rolle als Biomarker im Serum und Sputum, der einen Überblick über die allgemeine systemische Inflammation bei AATM und einen akuten Entzündungsstatus geben kann und wird dahingehend in der Literatur diskutiert. Insbesondere wird sie als Surrogat-Marker für neutrophile Inflammation genutzt (1,46,119,188,199). Eine aktuelle, 4 677 Patienten-umfassende klinische Studie zeigt eine Korrelation erhöhter MPO-Serumwerte mit schnell fallenden FEV₁-Werten und einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität (181). In dieser Dissertation wird zum ersten Mal gezeigt, dass es auch in einem kurzen Zeitraum, innerhalb einer Woche, zu signifikanten Schwankungen der Serum-MPO kommt. Dabei zeigten Patienten mit Substitutionstherapie, über die Woche betrachtet, leicht erniedrigte bis unveränderte Serumspiegel und damit einen protektiven Effekt der Prolastin®-Infusion in Bezug auf die MPO-Degranulation.

Ein weiterer, sich aktuell in der Forschung befindlicher, spezifischer Biomarker ist A α -Val³⁶⁰ (38). Dieser entsteht als Fibrinogen-Abbauprodukt nach der Freisetzung von NE und korreliert gut mit anderen Markern der neutrophilen Aktivierung wie MPO und Calprotectin. Neue Studien zeigen, dass A α -Val³⁶⁰ dabei gut den Schweregrad der Krankheit und ihre Progression widerspiegelt. Für die Substitutionstherapie zeigt sich dabei ein positiver Trend mit Abnahme des Markers über einen Zeitraum von sechs Monaten (38,39). Für weiterführende Studien wäre ein solcher Serummarker interessant, als dass er noch spezifischer die systemischen Abbauprozesse durch die

NE und die direkt zeitnahen Auswirkungen der Substitutionstherapie quantifizierbarer machen würde.

4.4 Ist eine Verunreinigung des Infusionsproduktes für die initiale Aktivierung der polymorph-nukleären Granulozyten verantwortlich?

Ein Auslöser der frühen, innerhalb von zwei Stunden auftretenden Degranulation von MMP-9 und MPO kann eine Immunglobulin-A (Ig-A) Verunreinigung der Prolastin®-Infusionslösungen sein (48). Eine Eigenschaft des AATs ist die Interaktion mit anderen Proteinen, z. B. Ig-A. Etwa ein Prozent des im humanen Serum vorkommenden Ig-As liegt dabei im Komplex mit AAT (Ig-A-AAT-Komplex) vor (127,235). Erhöhte Spiegel dieses Serumkomplexes werden z. B. bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet, wo sie mit einer verstärkten Destruktivität der Krankheit einhergehen. Der Entzündungsherd selbst ist dabei nicht die Quelle der Komplexbildung (57,104,206). Zusätzlich wird der Prozess der Ig-A-AAT-Komplexbildung durch die Oxidation von AAT mittels MPO gefördert. Diese Komplexe weisen anschließend nur noch zehn Prozent der ursprünglichen inhibitorischen Aktivität auf (207). Cowden *et al.* weisen in ihrer Veröffentlichung von 2005 bereits auf eine relative Ig-A-Verunreinigung der Prolastin®-Infusionslösung von 0,11 mg/mg Protein hin, die bei Zemaira® nicht messbar ist (48). Die von uns durchgeführten *ex vivo* Stimulationen von isolierten PI*MM PMNs mit Zemaira® führten außerdem zu keiner mit Prolastin® vergleichbaren MMP-9-Degranulation (Daten nicht gezeigt). Neuere Studien zeigen, dass die Bindung von Ig-A-Immunkomplexen an spezielle Rezeptoren eine pro-inflammatorische Antwort von PMNs provoziert (10,249). Die Auswirkungen von Ig-A-AAT-Immunkomplexen auf PMNs wurden bisher nicht weiter verfolgt. Mit Prolastin® infundiertes Ig-A könnte durch die systemische Komplexbildung mit AAT eine kurzzeitige Aktivierung mit MMP-9- bzw. MPO-Degranulation verursachen. Der Prozess der Komplexbildung von AAT und Ig-A würde zusätzlich durch die erhöhte MPO-Aktivität im Serum begünstigt werden, bzw. die Entstehung der Komplexe durch eine positive Rückkopplung gefördert werden.

Die vermehrte Degranulation von MPO und MMP-9 *ex vivo* deckt sich mit der erwähnten Annahme der Ig-A-Fraktion in der Infusionslösung. Die Ig-A-Fraktion bzw. die Komplexe gehen während der Herstellung von oxAATc und der anschließenden Rekonzentrierung nicht verloren. Alle Fraktionen bzw. Bestandteile des Prolastins® mit einer Masse über 30 kDa bleiben bei der Rekonzentrierung in Lösung, sind aber dem Oxidationsprozess mit NCS ausgesetzt. Die Bindung zwischen Ig-A und AAT besteht aus Disulfidbrücken, diese würden durch den *in vitro* Oxidationsprozess mit NCS gespalten werden (214,235). Die Oxidation von enthaltenen Immunoglobulinen selbst kann aber wiederum zu einer Aggregation der Antikörper führen (112). Für oxidiertes, aggregiertes Immunoglobulin G kann in entzündlichen Exsudaten beispielsweise eine Aktivierung von PMNs und eine konsekutive Superoxidgenerierung durch MPO beobachtet werden (148). Die Stimulation der PMNs mit freigesetzten und oxidierten Ig-A-Aggregaten könnte eine Begründung für die teilweise signifikant niedrigere MPO-Degranulation der PMNs nach Stimulation mit oxAATc darstellen. Gleiches gilt für den Versuch der Neutrophilen Adhäsion, wo es zu teils signifikant niedrigerer Adhäsion nach oxAATc-Stimulation kam. Ob die Aktivierung der PMNs durch oxidierte Ig-A-Aggregate mit der durch Ig-A-AAT-Komplexe gleichzusetzen ist, muss in nachfolgenden Studien überprüft werden.

Das neuerdings ausschließlich in den Vereinigten Staaten erhältliche Prolastin®-C unterläuft einer veränderten Aufreinigung mit verbesserter Ultrafiltration und einer Abwandlung des Pasteurisierungsprozesses (232). Der Hersteller gibt eine erhöhte Reinheit von min. 90 Prozent und geringere Plasmaverunreinigungen im Vergleich zu Prolastin® an, die mit dem Infusionsprodukt Zemaira® vergleichbar seien (221). Ob das weiter aufgereinigte Prolastin®-C zu keiner initialen Aktivierung führt bei einer dauerhaften Senkung der Degranulation, konnte in dieser Studie nicht überprüft werden.

Alle zum jetzigen Zeitpunkt verfügbaren AAT-Produkte werden aus human gepooltem Plasma gewonnen und weisen eine dementsprechende Heterogenität auf was die Zusammensetzung und die chemische Struktur angeht. Es kommt zu Modifikationen der Proteinladung, C-terminalen Aminosäureabbrüchen und der Anwesenheit oben

erwähnter zusätzlicher Plasmaproteine. Es gibt keine Hinweise, dass diese Modifikationen einen Effekt auf die inhibitorische Funktion, Sicherheit oder Wirksamkeit der AAT-Produkte hätten, die Auswirkungen auf die anti-inflammatorische und immunmodulatorische Wirkung sind aber nicht bekannt (64,74). Auch anti-apoptotische Effekte auf β -Zellen des Pankreas und die Inhibition der Caspase-3 scheinen durch die Ig-A-Kontamination nicht beeinträchtigt zu sein (256). Aktuelle Vergleichsstudien zur Serum-Verunreinigung bzw. der verbesserten Reinheit des neuen Produktes mit anderen Herstellern gibt es bisher nicht und wären damit für die zukünftige Anwendung von großem Interesse.

4.5 Limitationen der Studie

Kritisch zu betrachten sind die geringe Patientenzahl der unterschiedlichen Kohorten und die monozentrische Patientenrekrutierung. Aufgrund der seltenen Erkrankung steht in Deutschland insgesamt ein nur sehr kleines Patientenkollektiv für die Erforschung des AATMs zur Verfügung. Aktuell erhalten ca. 1 000 Patienten in Deutschland eine Substitutionstherapie mit Prolastin®, von denen ein wesentlicher Anteil im Rahmen dieser Studie rekrutiert werden konnte (persönliche Abfrage von Grifols). Des Weiteren bietet diese Studie als eine der wenigen den direkten Vergleich mit einer nicht-substituierten Patienten- bzw. gesunden Kontrollgruppe. Die Daten des Wochenverlaufs basieren auf der Messung jeweils eines Patienten und haben eine entsprechend geringe statistische Aussagekraft. Hier ist anzumerken, dass beide Patienten einen hohen zeitlichen Aufwand auf sich nehmen mussten. Die Studie ist jedoch die erste, die eine lückenlose Verfolgung der Biomarker eines substituierten und nicht-substituierten Patienten über den Verlauf einer Woche dokumentiert.

Ähnlich den COPD-Patienten, handelt es sich bei AATM-Patienten um ein klinisch sehr heterogenes Krankheitsbild. Dies wird zum einen durch die deutschen Behandlungsrichtlinien manifestiert, die nur eine selektierte Gruppe von Patienten für die Substitutionstherapie einschließen. Zum anderen sind der gesamte Krankheitsverlauf der Patienten und die positiven Effekte bezüglich der Substitutionstherapie individuell sehr unterschiedlich. Dies äußert sich in dieser Studie

auch im direkten Vergleich der Patienten des Wochenverlaufs. Trotz eines nur geringen Altersunterschiedes präsentiert sich der nicht-substituierte Patient mit einer deutlich besseren Lungenfunktion und einer geringeren Basissekretion von MMP-9.

Viele der positiven Effekte von reinem AAT konnten in dieser Studie nicht in dem Ausmaß reproduziert werden, wie sie teilweise in der Literatur beschrieben werden. Dies hängt mit dem zu Beginn festgelegten Versuchsaufbau zusammen. Die meisten Arbeitsgruppen verwenden bei der Zellstimulation chemisch reines AAT, welches nicht am Patienten selbst angewandt wird. Da unsere Arbeitsgruppe die direkten Effekte der Infusionstherapie nachweisen wollte, wurde bewusst das nicht weiter aufgereinigte Prolastin® in den *ex vivo* Stimulationen verwendet. Dieser Aufbau zielte auch auf die Beantwortung der Frage ab, warum sich der Nachweis klinischer Effekte bei AATM-Patienten so schwierig gestaltet, bzw. warum bestimmte AAT-Effekte im Rahmen der Substitutionstherapie nicht reproduzierbar sind (201).

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen erstmals, dass es im Rahmen der Prolastin®-Substitutionstherapie zu Serumschwankungen der inflammatorischen Biomarker MMP-9 und MPO kommt. Es konnte gezeigt werden, dass es nach der Infusion zu einer kurzzeitigen Aktivierung der PMNs kommt, während es im weiteren Wochenverlauf zu einer progredienten Reduktion der Degranulations-Biomarker, sogar unter die Werte von nicht-substituierten Patienten, kommt. Die Beobachtungen der Wochenverläufe bestätigen diese Annahmen. Über den gesamten Wochenverlauf betrachtet ist von einem eher positiven Effekt der Substitutionstherapie in Form einer Reduktion der PMN-Aktivität auszugehen. Ob aufgrund dieser Beobachtung auch ein langfristiger Vorteil für AATM-Patienten in Form einer erniedrigten Mortalität, bzw. langsameren Abnahme der Lungenfunktion und verbesserter Lebensqualität abgeleitet werden kann, ist zumindest fraglich und sollte in größer angelegten Studien mit einem verbesserten Infusionsprodukt überprüft werden. Allerdings zeigt die bislang 25-jährige Anwendung und die bislang nicht in Gänze publizierte RAPID Studie, dass

eine Emphysempression unter AAT-Augmentation wahrscheinlich verlangsamt wird (42).

Die Erkenntnisse legen des weiteren pleiotrope immunologische Effekte des Prolastins® nahe. Die genauen Gründe für die kurzzeitigen Degranulationen der PMNs nach Infusion *in vivo* und *ex vivo*, z. B. im Zusammenhang mit zusätzlichen Plasmabestandteilen der Infusionslösung, sollte in nachfolgenden Studien überprüft werden. Die in der Literatur mit reinem AAT erzielten anti-inflammatorischen Effekte konnten, zumindest *ex vivo*, nicht durch Prolastin® in Ursprungsform reproduziert werden.

Zusätzlich wurde eine zunehmende Komplexierung und Oxidierung von AAT bei substituierten Patienten über den Verlauf einer Woche beobachtet, was zumindest einen zunehmenden Verlust der Antielastase-Funktion nahelegt. Es ist anzunehmen, dass die infusionsassoziierte Degranulation der MPO für die Komplexierung und Oxidation mitverantwortlich gemacht werden kann; diese Hypothese sollte in zukünftigen Studien weiter verfolgt werden. Die Tatsache, dass die Verschiebungen zwischen monomerem und komplexiertem AAT im Serum durch die nephelometrische Messung bisher nicht erfasst werden, sollte eine Reflexion der bisherigen Methodik nach sich ziehen.

Ex vivo konnten keine von Prolastin® abweichenden pro- oder anti-inflammatorische Effekte des oxAATs auf die Degranulation oder neutrophile Adhäsion der PMNs beobachtet werden. Es ist möglich, dass neben der von uns gemessenen Degranulation weitere immunologische und anti-inflammatorische Effekte des AATs, unabhängig von der Form, nicht beeinträchtigt waren. Dies bietet interessante Ansätze für zukünftige Studien.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: α 1-Antitrypsin (AAT) ist ein im Körper ubiquitär vorkommendes Akute-Phase-Glykoprotein das neben seiner Aufgabe als Antiprotease wichtige immunmodulatorische Funktionen erfüllt. Bei Patienten mit vererbtem α 1-Antitrypsinmangel (AATM) kommt es aufgrund der relativ verringerten Serumkonzentration zu einer Unterschreitung des protektiven Antiproteasespiegels. Im langfristigen Krankheitsverlauf kommt es bei diesen Patienten häufig zu einer systemischen Inflammation und dem progredienten Fortschreiten eines panazinären Lungenemphysems, das dem Krankheitsbild der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung stark ähnelt. Als Hauptproduzenten der gewebedestruierenden Proteasen stehen die polymorph-nukleären Granulozyten (PMN) im Fokus des emphysematischen Umbaus. Im Rahmen aktueller Studien werden weitere Effekte dieser Zellen am pathophysiologischen Prozess untersucht. Die einzige spezifische Therapie ist die wöchentliche Substitution mit humanem AAT. Aufgrund der bisher unzureichenden Datenlage zur klinischen Wirksamkeit steht die Substitutionstherapie in der Literatur noch immer im Mittelpunkt der Diskussion.

Ziel: Ziel dieser Dissertation war es, die Effekte der Substitutionstherapie mit Prolastin® in Bezug auf die Aktivierung der PMNs in Patienten mit AATM zu untersuchen. Im Umkehrschluss sollten die Auswirkungen des hohen systemischen, inflammatorischen Potentials auf das infundierte AAT beobachtet werden.

Methoden: Für die Studie wurden die PMN-Degranulationsmarker Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Myeloperoxidase (MPO) im Serum von 22 AATM-Patienten mit nachgewiesenem PI*ZZ-Genotyp direkt vor sowie zwei Stunden bzw. drei Tage nach der Infusion analysiert. Bei einem Patienten gelang die Verlaufsbeobachtung der Marker über eine Woche. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der unterschiedlichen AAT-Fractionen im Serum der Patienten. Um die direkten Auswirkungen von Prolastin® und oxidiertem AAT beobachten zu können, wurden für die *ex vivo* Versuche PMNs von acht Patienten direkt vor und zwei Stunden nach Infusion isoliert. Anschließend wurden diese Zellen für vier Stunden mit

Prolastin® bzw. chemisch oxidiertem AAT (oxAATc) stimuliert und die Effekte auf die Freisetzung von MMP-9, MPO und Interleukin-8 bzw. die neutrophile Adhäsion beobachtet. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit den Werten nicht-substituierter AATM-Patienten bzw. gesunder Probanden verglichen.

Ergebnisse: Zwei Stunden nach Infusion zeigten substituierte Patienten eine kurzzeitige Aktivierung der PMNs in Form einer Degranulation von MMP-9 und MPO parallel zum AAT-Serumanstieg. Am dritten Tag lagen beide Marker unter dem Niveau nicht-substituierter Patienten. Zusätzlich lagen sowohl die MPO, als auch die MMP-9-Serumspiegel an Tag 3 unterhalb der Ausgangswerte vor Substitution; im Falle von MPO war dieser Unterschied auch statistisch signifikant. Die Wochenverläufe bestätigten den Trend einer niedrigeren PMN-Aktivierung gegen Mitte der Woche. In den weiteren Serumanalysen zeigte sich eine nach Infusion gemessene Komplexierung und Oxidation des infundierten AATs, die sich auch im Wochenverlauf bestätigte. In den *ex vivo* Versuchen konnte bei allen Probandengruppen eine vermehrte PMN-Aktivität in Form einer Freisetzung von MMP-9, MPO und IL-8 durch die Stimulation von Prolastin® und oxAATc beobachtet werden. Prolastin® und oxAATc unterschieden sich in diesem Fall nicht voneinander. Die neutrophile Adhäsion zeigte sich im Allgemeinen keine Veränderung durch Stimulation mit Prolastin® oder oxAATc.

Schlussfolgerung: Die MMP-9- und MPO-Degranulation deutet auf eine, zumindest kurzzeitige, infusionsbedingte Aktivierung der PMNs hin. Der anschließend relevante Abfall bis Tag 3 und darüber hinaus lässt indessen auf einen längerfristig anti-inflammatorischen Effekt der Substitutionstherapie schließen. Die Gründe für die kurzzeitige Aktivierung der PMNs sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse lassen auf pleiotrope Effekte der Substitutionstherapie mit Prolastin® schließen. Das infundierte AAT scheint nach Infusion, zumindest teilweise, bei systemischer Inflammation zu oxidieren und höhermolekulare Komplexe zu bilden. OxAAT hat, abgesehen vom Verlust der Antiproteasefunktion und verglichen mit Prolastin®, keine zusätzlich krankheitsfördernden, immunologischen Effekte auf die PMNs in ihrer zentralen pathophysiologischen Rolle.

6. Summary

Background: α 1-antitrypsin (AAT) is a ubiquitary present acute-phase protein which occupies an important immunomodulatory role besides its function as antiprotease protein. Based on the relatively decreased serum concentrations patients with α 1-antitrypsin deficiency (AATD) feature levels below the protective antiprotease threshold. In the long-run, these patients frequently develop a progressive panacinary lung-emphysema, similar to chronic obstructive pulmonary disease, as well as a systemic inflammation. As main-producers of the tissue-degrading proteases, polymorph-nuclear granulocytes (PMNs) are in the spotlight of the emphysematic modification. Further effects of these cells are being investigated in the latest studies in order to complete the picture of the pathophysiologic process. So far, the only specific therapy is the weekly substitution therapy. Due to insufficient data on the clinical efficacy, substitution therapy is still in the focus of academic discussion.

Aim: The purpose of this study was to investigate the effects of substitution therapy with Prolastin® on the activation of PMNs derived from patients with AATD. In reverse, we attempted to observe the impact of the high, inflammatory capability on the infused AAT.

Methods: The PMN-markers of degranulation, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and myeloperoxidase (MPO) were analysed in the sera of 22 AATD-patients with verified PI*ZZ genotype. Sera were taken directly before (pre), two hours (post) and three days after infusion (day 3). In one patient, markers were consequently followed up for the duration of one week. Additionally, the different AAT-fractions in the sera of the patients were determined. In order to monitor the direct effects of Prolastin® and oxidized AAT, PMNs from eight AATD-patients were isolated directly before and two hours after infusion for *ex vivo* experiments. Subsequently, the cells were stimulated for four hours with Prolastin® and chemically oxidized AAT (oxAATc), respectively. The effects were measured via the release of MMP-9, MPO and Interleukin-8 as wells as the neutrophil adhesion. All investigations were compared with the values of non-substituted patients and healthy probands, respectively.

Results: Substituted patients exhibited a short-term activation of PMNs in terms of a infusion-concomitant degranulation of MMP-9 and MPO two hours after infusion. Both markers were under the levels of non-substituted patients on day 3. Furthermore, MMP-9 and MPO levels dropped below the basic value (pre substitution) on day 3, although this was only statistically significant in the case of MPO. The weekly-timecourse confirmed the trend of low PMN activity in the middle of the week. Further serum analyses displayed a complexation and oxidation of the infused AAT, also apparent in the the weekly-timecourse. In *ex vivo* experiments we observed an increased activity of PMNs after stimulation with Prolastin® and oxAATc in terms of a degranulation of MMP-9, MPO and IL-8. Prolastin® and oxAATc themselves displayed no differences among each other. Neutrophil adhesion was not altered by the stimulation of Prolastin® and oxAATc.

Conclusion: The degranulation of MMP-9 and MPO suggests an infusion-related, short-term activation of PMNs. However, the relevant decline up to day 3 and beyond indicates a sustained anti-inflammatory effect of substitution therapy. So far, reasons for the short-term activation of PMNs have not been fully elucidated, but the results imply pleiotropic effects of substitution therapy with Prolastin®. Infused AAT appears to be oxidated after infusion in the environment of systemic inflammation and to form higher-molecular complexes. Despite that, oxAAT has no additional disease-modifying, immunologic effects on PMNs in their pathophysiologic role, disregarding the loss of the antiprotease function and in comparison with Prolastin®.

7. Literaturverzeichnis

1. Aaron SD, Vandemheen KL, Ramsay T, Zhang C, Avnur Z, Nikolcheva T, et al. Multi analyte profiling and variability of inflammatory markers in blood and induced sputum in patients with stable COPD. *Respir Res.* 2010 Jan;1–12.
2. Al-Omari M, Korenbaum E, Ballmaier M, Lehmann U, Jonigk D, Manstein DJ, et al. Acute-phase protein alpha1-antitrypsin inhibits neutrophil calpain I and induces random migration. *Mol Med.* 2011;865–74.
3. Alam S, Li Z, Janciauskiene S, Mahadeva R. Oxidation of Z {alpha}1-Antitrypsin by Cigarette Smoke Induces Polymerization: A Novel Mechanism of Early-Onset Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;261–9.
4. Alam S, Li Z, Atkinson C, Jonigk D, Janciauskiene S, Mahadeva R. Z α 1-antitrypsin confers a proinflammatory phenotype that contributes to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Apr;909–31.
5. Aldonyte R, Jansson L, Janciauskiene S. Concentration-dependent effects of native and polymerised alpha1-antitrypsin on primary human monocytes, in vitro. *BMC Cell Biol.* 2004 Mar;1–11.
6. An J-K, Blomenkamp K, Lindblad D, Teckman JH. Quantitative isolation of alphasAT mutant Z protein polymers from human and mouse livers and the effect of heat. *Hepatology.* 2005 Jan;160–7.
7. Aoshiba K, Nagai A, Ishihara Y, Kagawa J, Takizawa T. Effects of alpha 1-proteinase inhibitor on chemotaxis and chemokinesis of polymorphonuclear leukocytes: its possible role in regulating polymorphonuclear leukocyte recruitment in human subjects. *J Lab Clin Med.* 1993 Sep;333–40.
8. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec;20262–7.
9. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;12–24.
10. Bakema JE, van Egmond M. The human immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2011 Nov;612–24.
11. Bals R. Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;629–33.
12. Bals R, Köhnlein T. Alpha-Antitrypsin-Deficiency - Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. Stuttgart, Germany: Thieme; 2009. p. 1–4.

13. Basanta M, Jarvis RM, Xu Y, Blackburn G, Tal-Singer R, Woodcock A, et al. Non-invasive metabolomic analysis of breath using differential mobility spectrometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy smokers. *Analyst*. 2010;315–20.
14. Beatty K, Bieth J, Travis J. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem*. 1980 May 10;3931–4.
15. Beckman G, Beckman L, Lidén S. Association between psoriasis and the alpha 1-antitrypsin deficiency gene Z. *Acta Derm Venereol*. 1980 Jan;163–4.
16. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med*. 2003;634–9.
17. Bentwood BJ, Henson PM. The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J Immunol*. 1980 Feb;855–62.
18. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000 Oct;737–44.
19. Bergin DA, Reeves EP, Meleady P, Henry M, McElvaney OJ, Carroll TP, et al. alpha-1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *J Clin Invest*. 2010;4236–50.
20. Bergin DA, Reeves EP, Hurley K, Wolfe R, Jameel R, Fitzgerald S, et al. The circulating proteinase inhibitor α -1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity. *Sci Transl Med*. 2014 Jan;1–14.
21. Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;629–34.
22. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J*. 2006 Jan;77–84.
23. Blanco I, de Serres FJ, Carcaba V, Lara B, Fernández-Bustillo E. Alpha-1 antitrypsin deficiency PI*Z and PI*S gene frequency distribution using on maps of the world by an inverse distance weighting (IDW) multivariate interpolation method. *Hepat Mon*. 2012;e7434.
24. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997 May;3503–21.

25. Bosković G, Twining SS. Local control of alpha1-proteinase inhibitor levels: regulation of alpha1-proteinase inhibitor in the human cornea by growth factors and cytokines. *Biochim Biophys Acta*. 1998 May;37–46.
26. Bowlus CL, Willner I, Zern MA, Reuben A, Chen P, Holladay B, et al. Factors associated with advanced liver disease in adults with alpha1-antitrypsin deficiency. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;390–6.
27. Bradley LM, Douglass MF, Chatterjee D, Akira S, Baaten BJG. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to influenza virus-induced toll-like receptor signaling. *PLoS Pathog*. 2012 Jan;e1002641.
28. Brajer B, Batura-Gabryel H, Nowicka A, Kuznar-Kaminska B, Szczepanik A. Concentration of matrix metalloproteinase-9 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and a degree of airway obstruction and disease progression. *J Physiol Pharmacol*. 2008 Dec;145–52.
29. Brantly ML, Paul LD, Miller BH, Falk RT, Wu M, Crystal RG. Clinical features and history of the destructive lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Aug;327–36.
30. Brot N, Fliss H, Coleman T, Weissbach H. Enzymatic reduction of methionine sulfoxide residues in proteins and peptides. *Methods Enzymol*. 1984 Jan;352–60.
31. Burke W, Petersen G, Lynch P, Botkin J, Daly M, Garber J, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer - Hereditary nonpolyposis colon cancer. *JAMA*. 1997 Mar;915–9.
32. Campos MA, Wanner A, Zhang G, Sandhaus RA. Trends in the diagnosis of symptomatic patients with alpha-1- antitrypsin deficiency between 1968 and 2003. *Chest*. 2005;1179–86.
33. Cantin A, Bilodeau G, Bégin R. Granulocyte elastase-mediated proteolysis of alpha 1-antitrypsin in cystic fibrosis bronchopulmonary secretions. *Pediatr Pulmonol*. 1989;12–7.
34. Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants. *Am Rev Respir Dis*. 1978 Sep;617–21.
35. Carp H, Janoff A. Potential mediator of inflammation. Phagocyte-derived oxidants suppress the elastase-inhibitory capacity of alpha 1-proteinase inhibitor in vitro. *J Clin Invest*. 1980 Nov;987–95.

36. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J*. 2003 Apr;589–93.
37. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency - a model for conformational diseases. *N Engl J Med*. 2002 Jan;45–53.
38. Carter RI, Mumford RA, Treonze KM, Finke PE, Davies P, Si Q, et al. The fibrinogen cleavage product A α -Val360, a specific marker of neutrophil elastase activity in vivo. *Thorax*. 2011 Aug;686–91.
39. Carter RI, Ungurs MJ, Mumford RA, Stockley RA. A α -Val360: a marker of neutrophil elastase and COPD disease activity. *Eur Respir J*. 2013 Jan;31–8.
40. Cataldo D, Munaut C, Noël A, Franken F, Bartsch P, Foidart JM, et al. Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics. *Allergy*. 2001 Feb;145–51.
41. Chakrabarti S, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2005 Jul;279–88.
42. Chapman KR, Burdon J, Piitulainen E, Sandhaus R, Seersholm N, Stocks JM, et al. Augmentation Therapy Is Disease Modifying In Alpha-1 Antitrypsin Deficiency (AATD). Interim Analysis Of The RAPID Extension Study (ATS Journals). *D38 Updat Alpha One Defic*. 2014;A5788.
43. Chidwick K, Winyard PG, Zhang Z, Farrell AJ, Blake DR. Inactivation of the elastase inhibitory activity of alpha 1 antitrypsin in fresh samples of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1991 Dec;915–6.
44. Clark RA, Stone PJ, El Hag A, Calore JD, Franzblau C. Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of alpha 1-protease inhibitor by human neutrophils. *J Biol Chem*. 1981 Apr;3348–53.
45. Clemmensen SN, Jacobsen LC, Rorvig S, Askaa B, Christenson K, Iversen M, et al. Alpha-1-antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis. *Eur J Haematol*. 2011;517–30.
46. Cockayne DA, Cheng DT, Waschki B, Sridhar S, Ravindran P, Hilton H, et al. Systemic biomarkers of neutrophilic inflammation, tissue injury and repair in COPD patients with differing levels of disease severity. *PLoS One*. 2012 Jan;e38629.
47. Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, et al. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*. 2002 Jul;702–10.

48. Cowden DI, Fisher GE, Weeks RL. A pilot study comparing the purity, functionality and isoform composition of alpha-1-proteinase inhibitor (human) products. *Curr Med Res Opin.* 2005 Jun;877–83.
49. Creighton TE. Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea. *J Mol Biol.* 1979 Apr;235–64.
50. Croyle RT, Smith KR, Botkin JR, Baty B, Nash J. Psychological responses to BRCA1 mutation testing: preliminary findings. *Health Psychol.* 1997 Jan;63–72.
51. Crystal RG. Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy. *J Clin Invest.* 1990 May;1343–52.
52. Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 1999 Mar;1–14.
53. Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P, Lomas DA. A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem.* 1999 Apr;9548–55.
54. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin MZ heterozygotes: A longitudinal study of the general population. *Ann Intern Med.* 2002;270–9.
55. Dauriat G, Mal H, Jebrak G, Brugière O, Castier Y, Camuset J, et al. Functional results of unilateral lung volume reduction surgery in alpha1-antitrypsin deficient patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2006 Jan;201–6.
56. Davis ID, Burke B, Freese D, Sharp HL, Kim Y. The pathologic spectrum of the nephropathy associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Hum Pathol.* 1992 Jan;57–62.
57. Davis MJ, Dawes PT, Beswick E, Lewin I V, Stanworth DR. Sulphasalazine therapy in ankylosing spondylitis: its effect on disease activity, immunoglobulin A and the complex immunoglobulin A-alpha-1-antitrypsin. *Br J Rheumatol.* 1989 Oct;410–3.
58. Dawkins PA, Dawkins CL, Wood AM, Nightingale PG, Stockley JA, Stockley RA. Rate of progression of lung function impairment in alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J.* 2009 Jun;1338–44.
59. Demeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax.* 2007;806–13.

60. Dirksen A, Dijkman JH, Madsen F, Stoel B, Hutchison DC, Ulrik CS, et al. A randomized clinical trial of alpha(1)-antitrypsin augmentation therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;1468–72.
61. Dirksen A, Piitulainen E, Parr DG, Deng C, Wencker M, Shaker SB, et al. Exploring the role of CT densitometry: a randomised study of augmentation therapy in alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2009;1345–53.
62. Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MPC, Spanevello A, Carratú P, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer*. 2009;166–70.
63. Eden E, Hammel J, Rouhani FN, Brantly ML, Barker AF, Buist AS, et al. Asthma features in severe alpha(1)-antitrypsin deficiency - Experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute registry. *Chest*. 2003;765–71.
64. Ehlers MR. Immune-modulating effects of alpha-1 antitrypsin. *Biol Chem*. 2014 Oct;1187–93.
65. Elliott PR, Bilton D, Lomas DA. Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 May;670–4.
66. Elliott PR, Stein PE, Bilton D, Carrell RW, Lomas DA. Structural explanation for the deficiency of S alpha 1-antitrypsin. *Nat Struct Biol*. 1996;910–1.
67. Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med*. 1986 Mar;736–9.
68. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, et al. Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2015 Jan;82–3.
69. Esnault VL, Testa A, Audrain M, Rogé C, Hamidou M, Barrier JH, et al. Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int*. 1993 Jun;1329–32.
70. Evald T, Dirksen A, Keittelmann S, Viskum K, Kok-Jensen A. Decline in pulmonary function in patients with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lung*. 1990 Jan;579–85.
71. Fagerhol MK, Laurell CB. The Pi system-inherited variants of serum alpha 1-antitrypsin. *Prog Med Genet*. 1970 Jan;96–111.
72. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol*. 2008 Aug;2136–41.
73. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003 Nov;1317–27.

74. FDA (U.S. Food and Drug Administration). Heterogeneity of alpha1-proteinase inhibitor (human) products. 2013.
75. Fens N, Zwinderman AH, Van Der Schee MP, De Nijs SB, Dijkers E, Roldaan AC, et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;1076–82.
76. Ferrarotti I, Poplawska-Wisniewska B, T Trevisan M, Koepke J, Dresel M, Koczulla A-R, et al. How can we improve the detection of Alpha1-Antitrypsin Deficiency? *PLoS one*. 2015 Aug;e0135316
77. Fortunati E, Kazemier KM, Grutters JC, Koenderman L, Van den Bosch van JMM. Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. *Clin Exp Immunol*. 2009 Mar;559–66.
78. Fregonese L, Ferrari F, Fumagalli M, Luisetti M, Stolk J, Iadarola P. Long-term variability of desmosine/isodesmosine as biomarker in alpha-1-antitrypsin deficiency-related COPD. *COPD*. 2011 Oct;329–33.
79. Fregonese L, Stolk J, Frants RR, Veldhuisen B. Alpha-1 antitrypsin Null mutations and severity of emphysema. *Respir Med*. 2008 Jun;876–84.
80. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;448–54.
81. Gasparini S, Zuccatosta L, Bonifazi M, Bolliger CT. Bronchoscopic treatment of emphysema: state of the art. *Respiration*. 2012 Jan;250–63.
82. Geboes K, Ray MB, Rutgeerts P, Callea F, Desmet VJ, Vantrappen G. Morphological identification of alpha-I-antitrypsin in the human small intestine. *Histopathology*. 1982;55–60.
83. Glaser CB, Karic L, Parmelee S, Premachandra BR, Hinkston D, Abrams WR. Studies on the turnover of methionine oxidized alpha-1-protease inhibitor in rats. *Am Rev Respir Dis*. 1987 Oct;857–61.
84. Goltz D, Hittetiya K, Yadegari H, Driesen J, Kirfel J, Neuhaus T, et al. ATZ11 recognizes not only Z- α 1-antitrypsin-polymers and complexed forms of non-Z- α 1-antitrypsin but also the von Willebrand factor. *PLoS One*. 2014 Jan;e91538.
85. Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem*. 2009;147–76.
86. Greulich T, Kehr K, Nell C, Koepke J, Haid D, Koehler U, et al. A randomized clinical trial to assess the influence of a three months training program (Gym-based individualized vs. Calisthenics-based non-individualized) in COPD-patients. *Respir Res*. 2014 Jan;1–8.

87. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000;2363–6.
88. Guyot N, Wartelle J, Malleret L, Todorov AA, Devouassoux G, Pacheco Y, et al. Unopposed cathepsin G, neutrophil elastase, and proteinase 3 cause severe lung damage and emphysema. *Am J Pathol*. 2014 Aug;2197–210.
89. Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*. 2008;463–9.
90. Hattesoehl AD, Jorres RA, Dressel H, Schmid S, Vogelmeier C, Greulich T, et al. Discrimination between COPD patients with and without alpha 1-antitrypsin deficiency using an electronic nose. *Respirology*. 2011;1258–64.
91. Hendrick SJ, Silverman AK, Solomon AR, Headington JT. Alpha 1-antitrypsin deficiency associated with panniculitis. *J Am Acad Dermatol*. 1988 Apr;684–92.
92. Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, Sato H, et al. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J*. 2005;885–90.
93. Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2009 Aug;1231–8.
94. Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Sep;893–8.
95. Hoenderdos K, Condcliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;531–9.
96. Honda H, Ueda M, Kojima S, Mashiba S, Hirai Y, Hosaka N, et al. Assessment of myeloperoxidase and oxidative alpha1-antitrypsin in patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;142–51.
97. Howard OM, Dong HF, Shirakawa AK, Oppenheim JJ. LEC induces chemotaxis and adhesion by interacting with CCR1 and CCR8. *Blood*. 2000 Aug;840–5.
98. Huang JTJ, Chaudhuri R, Albarbarawi O, Barton A, Grierson C, Rauchhaus P, et al. Clinical validity of plasma and urinary desmosine as biomarkers for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2012 Jun;502–8.
99. Hubbard RC, Crystal RG. Strategies for aerosol therapy of alpha 1-antitrypsin deficiency by the aerosol route. *Lung*. 1990 Jan;565–78.

100. Hubbard RC, Sellers S, Czerski D, Stephens L, Crystal RG. Biochemical efficacy and safety of monthly augmentation therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency. *JAMA*. 1988 Sep;1259–64.
101. Hurley K, Lacey N, O'Dwyer CA, Bergin DA, McElvaney OJ, O'Brien ME, et al. Alpha-1 antitrypsin augmentation therapy corrects accelerated neutrophil apoptosis in deficient individuals. *J Immunol*. 2014 Oct;3978–91.
102. Hussain M, Mieli-Vergani G, Mowat AP. Alpha 1-antitrypsin deficiency and liver disease: clinical presentation, diagnosis and treatment. *J Inherit Metab Dis*. 1991 Jan;497–511.
103. Hutchison DC. Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Respir Med*. 1998 Mar;367–77.
104. Iwana K, Aotsuka S, Nishioka K. Prospective study of the clinical value of determining circulating IgA-alpha 1-antitrypsin complex using a prototype ELISA kit in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996 Nov;848–51.
105. Janciauskiene S, Larsson S, Larsson P, Virtala R, Jansson L, Stevens T. Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;592–600.
106. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Kohnlein T, Welte T. The discovery of alpha1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*. 2011;1129–39.
107. Janciauskiene S, Zelvyte I, Jansson L, Stevens T. Divergent effects of alpha1-antitrypsin on neutrophil activation, in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;288–96.
108. Janoff A, Carp H. Possible mechanisms of emphysema in smokers: cigarette smoke condensate suppresses protease inhibition in vitro. *Am Rev Respir Dis*. 1977;65–72.
109. Janoff A, Carp H, Lee DK, Drew RT. Cigarette smoke inhalation decreases alpha 1-antitrypsin activity in rat lung. *Science*. 1979;1313–4.
110. Janssens W, Lehouck A, Carremans C, Bouillon R, Mathieu C, Decramer M. Vitamin d beyond bones in chronic obstructive pulmonary disease; time to act. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;630–6.
111. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 1985;152–4.
112. Jasin HE. Generation of IgG aggregates by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system. *J Immunol*. 1983 Apr;1918–23.

113. Jeppsson JO. Amino acid substitution Glu leads to Lys alpha1-antitrypsin PiZ. *FEBS Lett.* 1976 Jun;195–7.
114. Johansson MW, Patarroyo M, Oberg F, Siegbahn A, Nilsson K. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J Cell Sci.* 1997;1133–9.
115. Johnson D, Travis J. Structural evidence for methionine at the reactive site of human alpha-1-proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 1978;7142–4.
116. Jonigk D, Al-Omari M, Maegel L, Müller M, Izykowski N, Hong J, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Sep;15007–12.
117. Van de Kant KDG, van der Sande LJTM, Jöbsis Q, van Schayck OCP, Dompeling E. Clinical use of exhaled volatile organic compounds in pulmonary diseases: a systematic review. *Respir Res.* 2012 Jan;1–23.
118. Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest.* 2000 Dec;1311–9.
119. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Feb;449–53.
120. Knoell DL, Ralston DR, Coulter KR, Wewers MD. Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jan;246–55.
121. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Koepke J, Jörres RA, Nell C, et al. Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. *Respir Med.* 2012 Jan;120–6.
122. Koczulla R, Bittkowski N, Andress J, Greulich T, Schroth S, Kotke V, et al. [The German registry of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency - a source for research on patient care]. *Pneumologie.* 2008 Nov;655–8.
123. Kolarich D, Turecek PL, Weber A, Mitterer A, Graninger M, Matthiessen P, et al. Biochemical, molecular characterization, and glycoproteomic analyses of alpha(1)-proteinase inhibitor products used for replacement therapy. *Transfusion.* 2006 Nov;1959–77.
124. Koyama H, Geddes DM. Erythromycin and diffuse panbronchiolitis. *Thorax.* 1997 Oct;915–8.

125. Lacy P, Eitzen G. Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front Biosci.* 2008 Jan;5559–70.
126. Larsson C. Natural history and life expectancy in severe alpha1-antitrypsin deficiency, Pi Z. *Acta Med Scand.* 1978 Jan;345–51.
127. Laurell CB, Thulin E. Complexes in plasma between light chain kappa immunoglobulins and alpha 1-antitrypsin respectively prealbumin. *Immunochemistry.* 1974 Nov;703–9.
128. Laurell C-B, Eriksson S. The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency. 1963. *COPD.* 2013 Mar;3–8.
129. Lawless MW, Greene CM, Mulgrew A, Taggart CC, O'Neill SJ, McElvaney NG. Activation of endoplasmic reticulum-specific stress responses associated with the conformational disease Z alpha 1-antitrypsin deficiency. *J Immunol.* 2004;5722–6.
130. Lefkowitz DL, Mills K, Morgan D, Lefkowitz SS. Macrophage activation and immunomodulation by myeloperoxidase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992;204–10.
131. Lefkowitz DL, Roberts E, Grattendick K, Schwab C, Stuart R, Lincoln J, et al. The endothelium and cytokine secretion: the role of peroxidases as immunoregulators. *Cell Immunol.* 2000;23–30.
132. Lerman C, Gold K, Audrain J, Lin TH, Boyd NR, Orleans CT, et al. Incorporating biomarkers of exposure and genetic susceptibility into smoking cessation treatment: effects on smoking-related cognitions, emotions, and behavior change. *Health Psychol.* 1997 Jan;87–99.
133. Lerman C, Narod S, Schulman K, Hughes C, Gomez-Caminero A, Bonney G, et al. BRCA1 testing in families with hereditary breast-ovarian cancer. A prospective study of patient decision making and outcomes. *JAMA.* 1996 Jun;1885–92.
134. Lewis M, Kallenbach J, Zaltzman M, Levy H, Lurie D, Baynes R, et al. Severe deficiency of alpha 1-antitrypsin associated with cutaneous vasculitis, rapidly progressive glomerulonephritis, and colitis. *Am J Med.* 1985 Oct;489–94.
135. Lewis NS. Comparisons between mammalian and artificial olfaction based on arrays of carbon black-polymer composite vapor detectors. *Acc Chem Res.* 2004;663–72.
136. Li Z, Alam S, Wang J, Sandstrom CS, Janciauskiene S, Mahadeva RC-P. Oxidized {alpha}1-antitrypsin stimulates the release of monocyte chemotactic protein-1 from lung epithelial cells: potential role in emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;388–400.

137. Lieberman J. Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency: a new hypothesis with supporting data. *Chest*. 2000 Nov;1480–5.
138. Lieberman J, Winter B, Sastre A. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest*. 1986;370–3.
139. Lindberg CA, Engström G, Gerhardsson De Verdier M, Nihlén U, Anderson M, Forsman-Semb K, et al. Total desmosines in plasma and urine correlate with lung function. *Eur Respir J*. 2012;839–45.
140. Lindblad D, Blomenkamp K, Teckman J. Alpha-1-antitrypsin mutant Z protein content in individual hepatocytes correlates with cell death in a mouse model. *Hepatology*. 2007 Oct;1228–35.
141. Llewellyn-Jones CG, Lomas DA, Carrell RW, Stockley RA. The effect of the Z mutation on the ability of alpha 1-antitrypsin to prevent neutrophil mediated tissue damage. *Biochim Biophys Acta*. 1994;155–60.
142. Loebermann H, Tokuoka R, Deisenhofer J, Huber R. Human alpha 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J Mol Biol*. 1984 Aug;531–57.
143. Lomas DA. Twenty years of polymers: a personal perspective on alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD*. 2013 Mar;17–25.
144. Lomas DA, Elliott PR, Carrell RW. Commercial plasma alpha1-antitrypsin (Prolastin) contains a conformationally inactive, latent component. *Eur Respir J*. 1997 Mar;672–5.
145. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 1992 Jun;605–7.
146. Lomas DA. Loop-sheet polymerization: The mechanism of alpha1-antitrypsin deficiency. *Respir Med*. 2000;3–6.
147. Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*. 1984 Oct;4828–37.
148. Lunec J, Blake DR, McCleary SJ, Brailsford S, Bacon PA. Self-perpetuating mechanisms of immunoglobulin G aggregation in rheumatoid inflammation. *J Clin Invest*. 1985 Dec;2084–90.
149. Luo L-Y, Jiang W. Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors. *Biol Chem*. 2006;813–6.

150. Lynch HT, Lemon SJ, Durham C, Tinley ST, Connolly C, Lynch JF, et al. A descriptive study of BRCA1 testing and reactions to disclosure of test results. *Cancer*. 1997 Jun;2219–28.
151. Mahadeva R, Chang WS, Dafforn TR, Oakley DJ, Foreman RC, Calvin J, et al. Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest*. 1999 Apr;999–1006.
152. Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, Stewart S, Janciauskiene S, Kelley DG, et al. Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol*. 2005 Feb;377–86.
153. Martin JP, Sesboue R, Charlionet R, Ropartz C. Does alpha-1-antitrypsin P1 null phenotype exist? *Humangenetik*. 1975 Nov;121–5.
154. Martin JP, Sesboue R, Charlionet R, Ropartz C, Pereira MT. Genetic variants of serum alpha1-antitrypsin (Pi types) in Portuguese. *Hum Hered*. 1976 Jan;310–4.
155. Mashiba S, Wada Y, Takeya M, Sugiyama A, Hamakubo T, Nakamura A, et al. In vivo complex formation of oxidized alpha(1)-antitrypsin and LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Nov;1801–8.
156. Masure S, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem*. 1991;391–8.
157. Matheson NR, Wong PS, Travis J. Enzymatic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979 May;402–9.
158. McBean J, Sable A, Maude J, Robinson-Bostom L. Alpha1-antitrypsin deficiency panniculitis. *Cutis*. 2003 Mar;205–9.
159. McElvaney NG, Stoller JK, Buist AS, Prakash UB, Brantly ML, Schluchter MD, et al. Baseline characteristics of enrollees in the National Heart, Lung and Blood Institute Registry of alpha 1-antitrypsin deficiency. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Chest*. 1997;394–403.
160. McGee D, Schwarz L, McClure R, Peterka L, Rouhani F, Brantly M, et al. Is PiSS Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Associated with Disease? *Pulm Med*. 2010;1–6.
161. Miller F, Kuschner M. Alpha1-antitrypsin deficiency, emphysema, necrotizing angitis and glomerulonephritis. *Am J Med*. 1969 Apr;615–23.
162. Miller SDW, Greene CM, McLean C, Lawless MW, Taggart CC, O'Neill SJ, et al. Tauroursodeoxycholic acid inhibits apoptosis induced by Z alpha-1 antitrypsin via inhibition of bad. *Hepatology*. 2007;496–503.

163. Miravittles M, Herr C, Ferrarotti I, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Luisetti M, et al. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol*. 2010;960–8.
164. Moraga F, Janciauskiene S. Activation of primary human monocytes by the oxidized form of alpha1-antitrypsin. *J Biol Chem*. 2000 Mar;7693–700.
165. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, et al. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest*. 2004;1952–7.
166. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;731–7.
167. Noble-Jamieson G, Thiru S, Johnston P, Friend P, Barnes ND. Glomerulonephritis with end-stage liver disease in childhood. *Lancet*. 1992 Mar;706–7.
168. Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agusti AGN. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;1664–8.
169. O'Donoghue DJ, Guickian M, Blundell G, Winney RJ. Alpha-1-proteinase inhibitor and pulmonary haemorrhage in systemic vasculitis. *Adv Exp Med Biol*. 1993 Jan;331–5.
170. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, Crystal RG. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest*. 1987;1366–74.
171. Omachi TA, Eisner MD, Rames A, Markovtsova L, Blanc PD. Matrix metalloproteinase-9 predicts pulmonary status declines in alpha1-antitrypsin deficiency. *Respir Res*. 2011;1–11.
172. Opdenakker G, Fibbe WE, Van Damme J. The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today*. 1998 Apr;182–9.
173. Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res*. 1991;317–24.
174. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;851–9.
175. Owen MC, Carrell RW, Brennan SO. The abnormality of the S variant of human alpha-1-antitrypsin. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Nov;257–61.

176. Ozeri E, Mizrahi M, Shahaf G, Lewis EC. α -1 antitrypsin promotes semimature, IL-10-producing and readily migrating tolerogenic dendritic cells. *J Immunol*. 2012 Jul;146–53.
177. Pääkkö P, Kirby M, du Bois RM, Gillissen A, Ferrans VJ, Crystal RG. Activated neutrophils secrete stored alpha 1-antitrypsin. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Dec;1829–33.
178. Padrines M, Schneider-Pozzer M, Bieth JG. Inhibition of neutrophil elastase by alpha-1-proteinase inhibitor oxidized by activated neutrophils. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Mar;783–90.
179. Pan S, Huang L, McPherson J, Muzny D, Rouhani F, Brantly M, et al. Single nucleotide polymorphism-mediated translational suppression of endoplasmic reticulum mannosidase I modifies the onset of end-stage liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2009 Jul;275–81.
180. Pandur E, Nagy J, Poór VS, Sarnyai A, Huszár A, Miseta A, et al. Alpha-1 antitrypsin binds preprohepcidin intracellularly and prohepcidin in the serum. *FEBS J*. 2009 Apr;2012–21.
181. Park HY, Man SFP, Tashkin D, Wise RA, Connett JE, Anthonisen NA, et al. The relation of serum myeloperoxidase to disease progression and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PLoS One*. 2013 Jan;e61315.
182. Parmar JS, Mahadeva R, Reed BJ, Farahi N, Cadwallader KA, Keogan MT, et al. Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;723–30.
183. Perlmutter DH, Kay RM, Cole FS, Rossing TH, Van Thiel D, Colten HR. The cellular defect in alpha 1-proteinase inhibitor (alpha 1-PI) deficiency is expressed in human monocytes and in *Xenopus* oocytes injected with human liver mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;6918–21.
184. Perlmutter DH, May LT, Sehgal PB. Interferon beta 2/interleukin 6 modulates synthesis of alpha 1-antitrypsin in human mononuclear phagocytes and in human hepatoma cells. *J Clin Invest*. 1989 Jul;138–44.
185. Perlmutter DH, Schlesinger MJ, Pierce JA, Campbell EJ, Rothbaum RJ, Schwartz AL. Induction of the stress response in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Trans Assoc Am Physicians*. 1988 Jan;33–41.
186. Perlmutter DH, Travis J, Punsal PIC-442624. Elastase regulates the synthesis of its inhibitor, alpha 1-proteinase inhibitor, and exaggerates the defect in homozygous PiZZ alpha 1 PI deficiency. *J Clin Invest*. 1988 Jun;1774–80.

187. Persson C, Subramaniam D, Stevens T, Janciauskiene S. Do native and polymeric alpha1-antitrypsin activate human neutrophils in vitro? *Chest*. 2006;1683–92.
188. Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P, et al. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1998 Aug;380–6.
189. Piitulainen E, Eriksson S. Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Eur Respir J*. 1999 Feb;247–51.
190. Piitulainen E, Sveger T. Respiratory symptoms and lung function in young adults with severe alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax*. 2002 Aug;705–8.
191. Pini L, Tiberio L, Venkatesan N, Bezzi M, Corda L, Luisetti M, et al. The role of bronchial epithelial cells in the pathogenesis of COPD in Z-alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Res*. 2014 Sep;1–10.
192. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax*. 2007 Jul;595–601.
193. Pradella CO, Belmonte GM, Maia MN, Delgado CS, Luise APT, Nascimento OA, et al. Home-Based Pulmonary Rehabilitation for Subjects With COPD: A Randomized Study. *Respir Care*. 2014 Sep;
194. Puhan MA, Gimeno-Santos E, Scharplatz M, Troosters T, Walters EH, Steurer J. Pulmonary rehabilitation following exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane database Syst Rev*. 2011 Oct;CD005305.
195. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, Macnee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;1055–60.
196. Rainger GE, Rowley AF, Nash GB. Adhesion-dependent release of elastase from human neutrophils in a novel, flow-based model: specificity of different chemotactic agents. *Blood*. 1998 Dec;4819–27.
197. Ray MB, Geboes K, Callea F, Desmet VJ. Alpha-1-antitrypsin immunoreactivity in gastric carcinoid. *Histopathology*. 1982;289–97.
198. Richter J, Ng-Sikorski J, Olsson I, Andersson T. Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec;9472–6.
199. Riise GC, Ahlstedt S, Larsson S, Enander I, Jones I, Larsson P, et al. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax*. 1995 Apr;360–5.

200. Rouhani F, Paone G, Smith N, Krein P, Barnes P, Brantly M. Lung neutrophil burden correlates with increased pro-inflammatory cytokines and decreased lung function in individuals with alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest*. 2000 May;250–1.
201. Russi EW. Alpha-1 antitrypsin: now available, but do we need it? *Swiss Med Wkly*. 2008 Apr;191–6.
202. Salahuddin P. Genetic variants of alpha1-antitrypsin. *Curr Protein Pept Sci*. 2010;101–7.
203. Schmid S, Koepke J, Dresel M, Hattesoehl A, Frenzel E, Perez J, et al. The effects of weekly augmentation therapy in patients with PiZZ α 1-antitrypsin deficiency. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012 Jan;687–96.
204. Schmidt EW, Rasche B, Ulmer WT, Konietzko N, Becker M, Fallise JP, et al. Replacement therapy for alpha-1-protease inhibitor deficiency in PiZ subjects with chronic obstructive lung disease. *Am J Med*. 1988 Jun;63–9.
205. Von Schönfeld J, Breuer N, Zotz R, Liedmann H, Wencker M, Beste M, et al. Liver function in patients with pulmonary emphysema due to severe alpha-1-antitrypsin deficiency (Pi ZZ). *Digestion*. 1996 Jan;165–9.
206. Scott LJ, Evans EL, Dawes PT, Russell GI, Matthey DL. Comparison of IgA-alpha1-antitrypsin levels in rheumatoid arthritis and seronegative oligoarthritis: complex formation is not associated with inflammation per se. *Br J Rheumatol*. 1998 Apr;398–404.
207. Scott LJ, Russell GI, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL. Oxidation of alpha1-proteinase inhibitor by the myeloperoxidase-hydrogen peroxidase system promotes binding to immunoglobulin A. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Feb;562–7.
208. Seersholm N, Wencker M, Banik N, Viskum K, Dirksen A, Kok-Jensen A, et al. Does alpha1-antitrypsin augmentation therapy slow the annual decline in FEV1 in patients with severe hereditary alpha1-antitrypsin deficiency? Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft zur Therapie von Lungenerkrankungen (WATL) alpha1-AT study group. *Eur Respir J*. 1997 Oct;2260–3.
209. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*. 2000;684–94.
210. Sengeløv H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. 1993 Feb;1535–43.

211. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem*. 1991;7870–5.
212. De Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest*. 2002 Nov;1818–29.
213. Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May;1290–3.
214. Shechter Y, Burstein Y, Patchornik A. Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry*. 1975;4497–503.
215. Silverman EK, Pierce JA, Province MA, Rao DC, Campbell EJ. Variability of pulmonary function in alpha-1-antitrypsin deficiency: clinical correlates. *Ann Intern Med*. 1989;982–91.
216. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*. 2000 Oct;2673–81.
217. Van Steenberghe W. Alpha 1-antitrypsin deficiency: an overview. *Acta Clin Belg*. 1993;171–89.
218. Stockley RA, Shaw J, Afford SC, Morrison HM, Burnett D. Effect of alpha-1-proteinase inhibitor on neutrophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990 Feb;163–70.
219. Stockley RA, Miravittles M, Vogelmeier C. Augmentation therapy for alpha-1 antitrypsin deficiency: towards a personalised approach. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Jan;149.
220. Stockley RA, Bayley DL, Unsal I, Dowson LJ. The effect of augmentation therapy on bronchial inflammation in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;1494–8.
221. Stocks JM, Brantly ML, Wang-Smith L, Campos MA, Chapman KR, Kueppers F, et al. Pharmacokinetic comparability of Prolastin®-C to Prolastin® in alpha1-antitrypsin deficiency: a randomized study. *BMC Clin Pharmacol*. 2010 Jan;13.
222. Stolk J. Alpha-1-antitrypsin augmentation treatment: does one size fit all? *Thorax*. 2006 Dec;1034.

223. Stoller JK, Rouhani F, Brantly M, Shahin S, Dweik RA, Stocks JM, et al. Biochemical efficacy and safety of a new pooled human plasma alpha(1)-antitrypsin, Respitin. *Chest*. 2002 Jul;66–74.
224. Stoller JK, Sandhaus RA, Turino G, Dickson R, Rodgers K, Strange C. Delay in diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: a continuing problem. *Chest*. 2005;1989–94.
225. Subramaniam D, Virtala R, Pawłowski K, Clausen IG, Warkentin S, Stevens T, et al. TNF-alpha-induced self expression in human lung endothelial cells is inhibited by native and oxidized alpha1-antitrypsin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008 Jan;258–71.
226. Summary E. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct;818–900.
227. Sveger T. Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *N Engl J Med*. 1976 Jun;1316–21.
228. Sveger T. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand*. 1988;847–51.
229. Swaim MW, Pizzo S V. Methionine sulfoxide and the oxidative regulation of plasma proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol*. 1988 Apr;365–79.
230. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*. 2000;27258–65.
231. Talecris Biotherapeutics Inc. FDA Approval: Alpha1-Proteinase Inhibitor (Human): Prolastin. 2005.
232. Talecris Biotherapeutics Inc. FDA Approval: Alpha1-Proteinase Inhibitor (Human): Prolastin-C. 2009.
233. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front Immunol*. 2014 Oct;1–7.
234. Thaler ER, Hanson CW. Medical applications of electronic nose technology. *Expert Rev Med Devices*. 2005;559–66.
235. Tomasi TB, Hauptman SP. The binding of alpha-1 antitrypsin to human IgA. *J Immunol*. 1974 Jun;2274–7.
236. Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to

- vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Jul;88–97.
237. Ueda M, Mashiba S, Uchida K. Evaluation of oxidized alpha-1-antitrypsin in blood as an oxidative stress marker using anti-oxidative alpha1-AT monoclonal antibody. *Clin Chim Acta*. 2002;125–31.
 238. Van der Veen BS, de Winther MPJ, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;2899–937.
 239. Vernooij JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EFM. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest*. 2004;1802–10.
 240. Vernooij JH, Küçükaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, et al. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Nov;1218–24.
 241. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Dec;1945–50.
 242. Viskum K, Kok-Jensen A. Criteria for alpha 1-antitrypsin substitution. *Lung*. 1990 Jan;586–91.
 243. Vissers MC, George PM, Bathurst IC, Brennan SO, Winterbourn CC. Cleavage and inactivation of alpha 1-antitrypsin by metalloproteinases released from neutrophils. *J Clin Invest*. 1988 Aug;706–11.
 244. Vogelmeier C, Buhl R, Criege CP, Gillissen A, Kardos P, Kohler D, et al. [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie*. 2007;e1–40.
 245. Vogelmeier CF, Wouters EFM. Treating the systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 Aug;376–9.
 246. Wang W, Jian Z, Guo J, Ning X. Increased levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. *Life Sci*. 2014 Sep;19–23.
 247. Warter J, Storck D, Grosshans E, Metais P, Kuntz JL, Klumpp T. [Weber-Christian syndrome associated with an alpha-1 antitrypsin deficiency. Familial investigation]. *Ann Med Interne (Paris)*. 1972 Oct;877–82.

248. Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet*. 2007;786–96.
249. Wehrli M, Cortinas-Elizondo F, Hlushchuk R, Daudel F, Villiger PM, Miescher S, et al. Human IgA Fc Receptor Fc RI (CD89) Triggers Different Forms of Neutrophil Death Depending on the Inflammatory Microenvironment. *J Immunol*. 2014 Oct;5649–59.
250. Wencker M, Fuhrmann B, Banik N, Konietzko N. Longitudinal follow-up of patients with alpha(1)-protease inhibitor deficiency before and during therapy with IV alpha(1)-protease inhibitor. *Chest*. 2001 Mar;737–44.
251. Wewers MD, Casolaro MA, Sellers SE, Swayze SC, McPhaul KM, Wittes JT, et al. Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *N Engl J Med*. 1987 Apr;1055–62.
252. Wouters EFM. Chronic obstructive pulmonary disease. 5: systemic effects of COPD. *Thorax*. 2002 Dec;1067–70.
253. Yang JJ, Preston GA, Pendergraft WF, Segelmark M, Heeringa P, Hogan SL, et al. Internalization of proteinase 3 is concomitant with endothelial cell apoptosis and internalization of myeloperoxidase with generation of intracellular oxidants. *Am J Pathol*. 2001;581–92.
254. Young RP, Hopkins R, Eaton TE. Pharmacological actions of statins: Potential utility in COPD. *Eur Respir Rev*. 2009;222–32.
255. Zeng M, Li Y, Jiang Y, Lu G, Huang X, Guan K. Local and systemic oxidative stress status in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Can Respir J*. 2013;35–41.
256. Zhang B, Lu Y, Campbell-Thompson M, Spencer T, Wasserfall C, Atkinson M, et al. Alpha1-antitrypsin protects beta-cells from apoptosis. *Diabetes*. 2007 May;1316–23.
257. Zhou H, Fischer HP. Liver carcinoma in PiZ alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Surg Pathol*. 1998 Jun;742–8.
258. Zhu A, Ge D, Zhang J, Teng Y, Yuan C, Huang M, et al. Sputum myeloperoxidase in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Med Res*. 2014 Jan;1–11.
259. Zorzetto M, Russi E, Senn O, Imboden M, Ferrarotti I, Tinelli C, et al. SERPINA1 gene variants in individuals from the general population with reduced alpha1-antitrypsin concentrations. *Clin Chem*. 2008 Aug;1331–8.
260. Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ*. 1997 Jan;397–415.

261. A registry of patients with severe deficiency of alpha 1-antitrypsin. Design and methods. The Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Chest*. 1994 Oct;1223–32.
262. Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jul;49–59.
263. Pulmonary rehabilitation-1999. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 May;1666–82.

8. Anhang

8.1 Patienteninformation, Einwilligung und Fragebogen

Patienteninformation zur

Pilotstudie zum Vergleich der inflammatorischen Reaktivität bei Patienten mit Alpha-1-Antitrypsin Mangel, COPD Patienten ohne Alpha-1-Antitrypsinpatienten und gesunden Kontrollen

Studienleiter:

PD Dr. A-Rembert Koczulla

an der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie der

Philipps-Universität Marburg,

Baldingerstraße 1, 35033 Marburg, Tel 06421- 586 4956

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir bitten Sie für die Durchführung einer Studie um Ihre Teilnahme. Wir untersuchen die Entzündungszellen in Ihrem Blut. Hierfür wollen wir zusätzlich zu der Ganzkörperplethysmographie und der Routineblutuntersuchung in der Ambulanz vier weitere Röhrchen Blut für unsere Studie entnehmen (insges ca. 85 ml). Es muss also nicht erneut gestochen werden. Aus dem Blut sollen die Entzündungszellen isoliert werden und ihre Funktion untersucht werden.

Für die zweite studienbedingte Untersuchung bitten wir Sie in ein spezielles Gerät auszuatmen, dass die Stoffe in Ihrer Ausatemluft direkt analysiert. Eine Abbildung des Gerätes ist unten aufgezeichnet. Des Weiteren bitten wir Sie für 10 Minuten in eine - 20°C Rtube-Röhre ein und auszuatmen, dies dient zur Gewinnung von Atemwegskondensat (AWK). Das Kondensat wird anschließend zur Messung von lokalen Entzündungsparametern verwendet.

Es erfolgt eine Speicherung der Daten, allerdings werden Ihre persönlichen Daten verschlüsselt gespeichert, z.B. wird Ihnen ein Zahlencode oder eine Buchstabenkombination zugewiesen. Nur mit Hilfe einer speziellen Liste (Schlüsselliste), kann von den pseudonymisierten Daten auf Ihre Person

rückgeschlossen werden. Diese Schlüsselliste wird am Ende der Studie vernichtet. Zu der Schlüsselliste hat nur der Studienleiter Zugang.

Der studienbedingte Zeitaufwand für das Sammeln von AWK und der Analyse der Ausatemluft beträgt ca. 15 min

Die Blutentnahme dauert ca. 1 min.

Insgesamt Zeitaufwand ca. 16 min

Gerät zur Durchführung der Ausatemluftuntersuchung:



Zu den Risiken der Blutabnahme gehört das Entstehen blauer Flecken im Bereich der Einstichstelle. Manchmal kommt es zu einer geringen, wenige Minuten anhaltenden Blutung, wenn die Nadel herausgezogen wird. Es besteht das sehr geringe Risiko einer lokalen oder allgemeinen Infektion. In extrem seltenen Fällen kann es zu einer Verletzung eines Hautnervs kommen. Es werden Vorkehrungen getroffen, um die Risiken für diese möglichen Komplikationen zu minimieren.

Selbstverständlich erfolgt Ihre Teilnahme an der Studie freiwillig. Es steht Ihnen frei, Ihr Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen zu widerrufen, wodurch Ihnen keinerlei Nachteile entstehen würden.

Falls Sie weitere Fragen haben sollten, können Sie jederzeit den Studienleiter, Herrn PD Dr. A.-Rembert Koczulla kontaktieren.

PD Dr. A.-Rembert Koczulla

Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie

Tel. +49 (0) 6421- 58-6 4956

— Erfassungsbogen AATD —

Name: ♀ ☐ ♂ ☐

Geburtsdatum: _____ Datum: _____

Adresse: _____ Uhrzeit: _____

Telefonnummer: _____

Einverständniserklärung Lungenfunktion Blutentnahme Serum für IEF
 Ja ☐ Nein ☐ Ja ☐ Nein ☐ Ja ☐ Nein ☐ Ja ☐ Nein ☐

Letzte Medikation: _____ Einnahmezeit _____
 Letzte Mahlzeit: _____ Einnahmezeit _____

seit	Beschwerden	Medikation
Ekzem		
Rhinitis		
Asthma		
Allergie		
Letzte Erkältung		

Behandlung: Hausarzt ☐ _____ Spezialist ☐ _____

Raucher: Ja ☐ Nein ☐ seit: _____ Packungsjahre: _____ aufgehört
 Ja ☐ Nein ☐

Letzte Zigarette: _____ Datum _____ Uhrzeit _____ Urlaub: _____ Datum _____ Urlaubsziel _____

Tumor: _____ Histologie _____ Beschwerden _____ Therapie _____

Andere Studien:

Aktuelle Medikation:

8.2 Publikationsverzeichnis

1. Erstautorschaften:

Koepke J and **Dresel M**, Schmid S, Greulich T, Beutel B, Schmeck B, Vogelmeier C, Janciauskiene S and Koczulla AR.

Therapy with Plasma Purified Alpha1-Antitrypsin (Prolastin®) Induces Time-Dependent Changes in Plasma Levels of MMP-9 and MPO. *PLoS one*. 2015 Jan; e0117497

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25635861>

Background: The common Z mutation (Glu342Lys) of α 1-antitrypsin (A1AT) results in the polymerization and intracellular retention of A1AT protein. The concomitant deficiency of functional A1AT predisposes PiZZ subjects to early onset emphysema. Clinical studies have implied that, among the biomarkers associated with emphysema, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is of particular importance. Increased plasma MMP-9 levels are proposed to predict the decline of lung function as well as greater COPD exacerbations in A1AT deficiency-associated emphysema. The aim of the present study was to investigate the effect of A1AT therapy (Prolastin®) on plasma MMP-9 and myeloperoxidase (MPO) levels.

Methods: In total 34 PiZZ emphysema patients were recruited: 12 patients without and 22 with weekly intravenous (60 mg/kg body weight) A1AT therapy. The quantitative analysis of A1AT, MMP-9 and MPO was performed in serum and in supernatants of blood neutrophils isolated from patients before and after therapy.

Results: Patients with Prolastin® therapy showed significantly lower serum MMP-9 and MPO levels than those without therapy. However, parallel analysis revealed that a rapid infusion of Prolastin® is accompanied by a transient elevation of plasma MMP-9 and MPO.

Conclusions: Experiments with freshly isolated blood neutrophils confirmed that therapy with Prolastin® causes transient MMP-9 and MPO release. Prolastin® induced the rapid release of MMP-9 and MPO when added directly to neutrophil cultures and this reaction was associated with the presence of IgA in A1AT preparation. Our data support the conclusion that changes in plasma levels of MMP-9 and MPO mirror the effect of Prolastin® on blood neutrophils.

2. Mitautorschaften

Ferrarotti I and Poplawska-Wisniewska B, Trevisan MT, Koepke J, **Dresel M**, Koczulla AR, Ottaviani S, Baldo R, Gorrini M, Sala G, Cavallon L, Welte T, Chorostowska-Wynimko J, Luisetti, M, Janciauskiene, S.

How can we improve the detection of Alpha1-Antitrypsin Deficiency? *PLoS one*. 2015 Aug; e0135316

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26270547>

Background: The Z deficiency of alpha1-antitrypsin (A1ATD) is under-recognized condition. A1AT is the main protein in the alpha1-globulin fraction of serum protein

electrophoresis (SPE); however the evaluation of alpha1-globulin protein fraction received little attention. Serum Z-type A1AT manifests polymeric forms but their interference with quantitative immunoassays has not been discussed.

Methods: 214 894 samples were evaluated by the SPE. Patients with A1AT level ≤ 0.92 g/L measured by nephelometry were recalled to complete A1ATD diagnosis. In parallel, to qualitatively and quantitatively characterize A1AT sera samples from PiZZ (n = 10) and PiMM (n = 10) subjects were subjected to non-denaturing 7.5 % PAGE and 7.5 % SDS-PAGE followed by Western blot. Moreover, purified A1AT was heated at 60 °C and analyzed by a non-denaturing PAGE and 4-15 % gradient SDS-PAGE followed by Western blot as well as by isoelectrofocusing and nephelometry.

Results: 966 from 214 894 samples evaluated by the SPE manifested ≤ 2.8 percentage or a double band in the alpha1-zone. According to nephelometry data, 23 samples were in the severe (A1AT ≤ 0.49 g/L) and 462 in the intermediate (A1AT $> 0.49 \leq 1.0$ g/L) A1ATD zone. We detected 9 cases with severe and 26 with intermediate A1ATD. Parallel experiments revealed that polymerization of M-type A1AT, when measured by nephelometry or isoelectrofocusing, causes inaccurate results, leading to the erroneous impression that it was a Z but not M-type A1AT.

Conclusions: We illustrate the need for confirmation of Z A1AT values by “state of the art” method. Clinicians should consider the A1ATD inpatient who exhibits serum polymers and low α 1-globulin protein levels by SPE.

Schmid S, Koepke J, **Dresel M**, Hattesoehl A, Frenzel E, Perez J, Lomas DA, Miranda E, Greulich T, Noeske S, Wencker M, Vogelmeier C, Janciauskiene S and Koczulla AR.

The effects of weekly augmentation therapy in patients with PiZZ α 1-antitrypsin deficiency. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. September 2012; 687–96.

Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3468059&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Background: The major concept behind augmentation therapy with human α 1-antitrypsin (AAT) is to raise the levels of AAT in patients with protease inhibitor phenotype ZZ (Glu342Lys)-inherited AAT deficiency and to protect lung tissues from proteolysis and progression of emphysema. Objective: To evaluate the short-term effects of augmentation therapy (Prolastin®) on plasma levels of AAT, C-reactive protein, and chemokines/cytokines.

Methods: Serum and exhaled breath condensate were collected from individuals with protease inhibitor phenotype ZZ AAT deficiency-related emphysema (n = 12) on the first, third, and seventh day after the infusion of intravenous Prolastin. Concentrations of total and polymeric AAT, interleukin-8 (IL-8), monocyte chemotactic protein-1, IL-6, tumor necrosis factor- α , vascular endothelial growth factor, and C-reactive protein were determined. Blood neutrophils and primary epithelial cells were also exposed to Prolastin (1 mg/mL).

Results: There were significant fluctuations in serum (but not in exhaled breath condensate) levels of AAT polymers, IL-8, monocyte chemotactic protein-1, IL-6, tumor necrosis factor- α , and vascular endothelial growth factor within a week of

augmentation therapy. In general, augmented individuals had higher AAT and lower serum levels of IL-8 than nonaugmented subjects. Prolastin added for 3 hours to neutrophils from protease inhibitor phenotype ZZ individuals in vitro reduced IL-8 release but showed no effect on cytokine/chemokine release from human bronchial epithelial cells.

Conclusions: Within a week, augmentation with Prolastin induced fluctuations in serum levels of AAT polymers and cytokine/chemokines but specifically lowered IL-8 levels. It remains to be determined whether these effects are related to the Prolastin preparation per se or to the therapeutic efficacy of augmentation with AAT.

3. Kongresse: Vorträge und Posterpräsentationen

Koepke J, **Dresel M**, Greulich T, Janciauskiene S, Vogelmeier C, , Koczulla AR.
Short term effects of alpha-1-antitrypsin substitution therapy on the degranulation of neutrophil granulocytes. 22. *Annual Congress of the European Respiratory Society*, 01.-05.09.2012, Vienna, Austria. 388. Available from: http://www.ers-education.org/ersmade/abstract_print_12/files/Abstract_book_2012.pdf

Koepke J, **Dresel M**, Vogelmeier C, Greulich T, Koczulla AR.
Effects Of Augmentation Therapy On Neutrophil Granulocytes In α 1-Antitrypsin-Deficiency. *American Thoracic Society 2012 International Conference*, 18.-23.05.2012. San Francisco, California. B27: Balancing Act: Novel Functions of the Protease and Antiproteases in the Lung: pp. A2651-A2651. 2012. Available from: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1_Meeting_Abstracts.A2651

Muramatsu R, Koepke J, **Dresel M**, Hattesohl A, Hofmann G, Kauß M, Damm T, Greulich T, Vogelmeier C, Koczulla AR.
Examining the response of primary Human Bronchial Epithelial Cells in an Air liquid interface culture system after stimulation with concentrated Exhaled Breath Condensate. 53. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.*, 29.03.-01.04.2012, Nürnberg. Sektion Zellbiologie von Lungenerkrankungen.

Dresel M, Koepke J, Muramatsu R, Hattesohl A, Greulich T, Vogelmeier C, Koczulla AR.
Auswirkungen von oxidiertem α 1-Antitrypsin auf neutrophile Granulozyten und humanes Lungenepithel. 53. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.*, 29.03.-01.04.2012, Nürnberg. Sektion Zellbiologie von Lungenerkrankungen. A14.

Koepke J, **Dresel M**, Hattesohl A, Greulich T, Vogelmeier C, Koczulla AR.
Einfluss von Alpha-1-Antitrypsin auf die Ausbildung von NET-Strukturen bei Alpha-1-Antitrypsinmangelpatienten. 53. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.*, 29.03.-01.04.2012, Nürnberg. Sektion Zellbiologie. A25.

Dresel M, Koepke J, Muramatsu R, Hattesohl A, Greulich T, Vogelmeier C, Koczulla AR. Effects of oxidized α_1 -antitrypsin on neutrophil granulocytes and human bronchial epithelium. *Herbsttreffen der Sektionen Zellbiologie, Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.* 2011. 11.-12.11.2011, Homburg an der Saar. Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0031-1296105>

Koepke J, **Dresel M**, Muramatsu R, Hattesohl A, Greulich T, Vogelmeier C, Koczulla AR. Einfluss von Alpha 1-Antitrypsin auf die Ausbildung von NET-Strukturen bei Alpha-1-Antitrypsinmangelpatienten. *Herbsttreffen der Sektionen Zellbiologie, Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.* 2011. 11.-12.11.2011, Homburg an der Saar. Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0031-1296116>

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren:

in Marburg:

Barth, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Becker, Bette, Berger, Bertoune, Bien, Bösner, Bohlander, Carl, Cetin, Cottebrune, Czubayko, Del Rey, Daut, Dinges, Dodel, Donner-Banzhoff, Ellenrieder, Eberhart, Efe, Eivazi, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geks, Goeze, Görg, Gress, Grundmann, Hegele, Hertl, Höffken, Holland, Hoyer, Hundt, Jaques, Jerentrupp, Kamp-Becker, Kann, Kaufmann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Kiriazidis, Klose, Knöppel, Köhler, Koczulla, Kolb-Niemann, König, Konrad, Koolmann, Kortus-Götze, Kühne, Kühnert, Kruse, Kussin, Leonhardt, Lill, Lingenfelder, Löffler, Lohoff, Magel, Maier, Maisch, Meissner, Merte, Michl, Mirow, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neff, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nikolaizik, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Preissig-Müller, Printz, Quaschner, Ramaswamy, Renz, Rixin, Richter, Riemer, Riera-Knorrenschild, Rinke, Risse, Röhm, Ruchholtz, Schade, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schoner, Schu, Schul, Schulze, Schütz, Seifart, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Sommer, Steiniger, Strzelczyk, Teymoortash, Thum, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westerman, Westermann, Wiegand, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Ziring, Zorembo

in Fulda, Hamburg und Hofheim am Taunus, Deutschland:

Aumiller, Indraswari, Isselstein, Köppen, Sasaki, Scheel, Schenkelberg, van de Loo, Weber

in Montréal, Kanada:

Dubeau, Durcan, Gendron, Giamcomini, O’Ferrall

in Newcastle, UK:

French, Jaques, Talbot

in Riggisberg, Schweiz:

Duthiers, Isenegger, Zehnder

8.4 Danksagung

Besonders hervorheben und bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Janine Koepke die mich bei dieser Arbeit vom ersten Tag an bis zum letzten Feinschliff während der Korrektur hervorragend unterstützt, beraten und betreut hat: ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen! Danke für gute wissenschaftliche Diskussionen, Anregungen und die Begleitung durch die Hochs und Tiefs dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Dir für die vielen schönen und sehr lustigen Momente und Erlebnisse bedanken, die mir eine unvergessliche Laborzeit beschert haben.

Vielen Dank an meinen Betreuer und Doktorvater Rembert Koczulla für die Ideengebung, die wissenschaftliche Unterstützung und Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die hervorragende Betreuung in den vergangenen vier Jahren!

Akira Hattesoehl danke ich für die Unterstützung, Hilfe und Versorgung an langen Laborabenden, der statistischen Auswertung der Daten und einer nie langweiligen Zeit im Büro.

Ein besonderer Dank gilt Gisela Hofmann, Thomas Damm und Isabell Weigand für die immer tatkräftige Unterstützung und Assistenz im Labor, sowie der restlichen Arbeitsgruppe für die vielen lustigen Erlebnisse und Momente während meiner Laborzeit und den Betriebsausflügen. Außerdem möchte ich Gisela Hofmann und Annette Patzke für die immer zuverlässige Durchführung der Lungenfunktionen danken, sowie den Krankenschwestern der Pneumologie-Ambulanz für die Hilfe und die freundliche Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Herrn Prof. Bernd Schmeck und seine Arbeitsgruppe der molekularen Pneumologie für die Möglichkeit zur Nutzung von Laborgerätschaften, Teilnahme an Laborseminaren und die freundliche Zusammenarbeit.

Danke an meinen Vater für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit und an meinen Bruder Thorsten für die zeichnerische Gestaltung einer Abbildung.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, meiner Freundin Nikola und meinen Freunden für die immerwährende Unterstützung in manchmal schwierigen Phasen und die positiven Rückmeldungen danken!

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Divergente Effekte der Substitutionstherapie auf polymorph-nukleäre Granulozyten beim hereditären α 1-Antitrypsinmangel“ in der Abteilung Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rembert Koczulla mit Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Janine Koepke ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Koepke J and **Dresel M**, Schmid S, Greulich T, Beutel B, Schmeck B, Vogelmeier C, Janciauskiene S and Koczulla AR.

Therapy with Plasma Purified Alpha1-Antitrypsin (Prolastin®) Induces Time-Dependent Changes in Plasma Levels of MMP-9 and MPO. *PLoS one*. 2015 Jan; e0117497

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25635861>

Ferrarotti I and Poplawska-Wisniewska B, Trevisan MT, Koepke J, **Dresel M**, Koczulla AR, Ottaviani S, Baldo R, Gorrini M, Sala G, Cavallon L, Welte T, Chorostowska-Wynimko J, Luisetti, M, Janciauskiene, S.

How can we improve the detection of Alpha1-Antitrypsin Deficiency? *PLoS one*. 2015 Aug; e0135316

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26270547>